n. sp. Lote VI. 56.

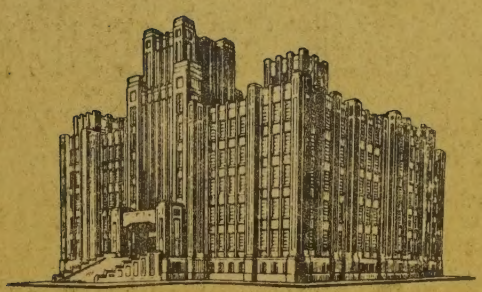
Vol. 22 1955

ARQUIVOS

DO

INSTITUTO BIOLÓGICO

• Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura •



SECRETARIA DA AGRICULTURA

SÃO PAULO

BRASIL

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
31 MAY 1956

Os Arquivos do Instituto Biológico aparecem sob a forma de artigos separados publicados à medida de sua apresentação, os quais anualmente são reunidos em um volume, que pode ser adquirido por permuta ou compra pelo preço marcado na capa.

Os artigos separados, impressos em número limitado, poderão ser adquiridos ao preço de Cr$ 2,00 no Serviço de Vendas do Instituto Biológico.

Toda a correspondência referente aos Arquivos deve ser dirigida ao Diretor Geral do Instituto Biológico, (Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura) Caixa postal 7119, São Paulo, Brasil.

Diretor Geral: Paulo Nóbrega

The "Arquivos do Instituto Biológico" appear in the form of separate articles published as they are presented, and are annually united in one volume, which may be acquired by exchange or purchase at the price indicated on the cover.

The separate articles may be purchased for Cr$ 2,00 from the Serviço de Vendas of the Instituto Biológico.

All correspondence referring to the "Arquivos" should be addressed to - Diretor Geral do Instituto Biológico, P. O. Box 7119, São Paulo, Brazil.

PREÇO DÊSTE NÚMERO CR$ 50,00

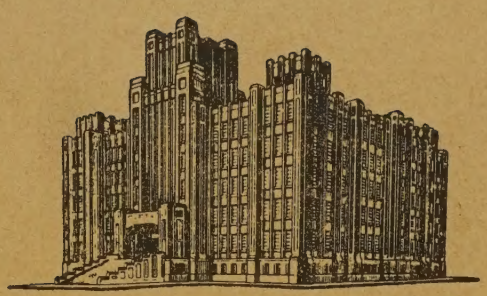
Vol. 22 1955

ARQUIVOS

DO

INSTITUTO BIOLÓGICO

• Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura •



SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

SUMÁRIO

Pags.

1. **Leiderman, Leão** — ESTUDOS DA AÇÃO DE MODERNOS INSETICIDAS ORGÂNICOS SÔBRE A "LAGARTA DOS MILHARAIS" LAPHYGMA FRUGIPERDA (ABBOT & SMITH, 1797) EM MILHO. (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE).
Studies on the action of the newer organic insecticides on the "Fall Armyworm" Laphygma frugiperda (ABBOT & SMITH, 1797) *in corn* 1-12

2. **Leiderman, Leão** — O COMBATE DAS LAGARTAS DE HELIOTHIS OBSOLETA (FABR., 1793) (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE) EM ESPIGAS DE MILHO COM MODERNOS INSETICIDAS ORGÂNICOS.
Control of the "Corn Earworm" Heliothis obsoleta (FABR., 1793) *in sweet corn ears with some organic insecticides* 13-22

3. **Capoor, Vireshwar Nath** — DUAS ESPÉCIES NOVAS DO GÊNERO ANASTREPHA (DIPT., TRYPETIDAE). Estampas 1, 2 e 3.
Two new species of the genus Anastrepha 23-30

4. **Capoor, Vireshwar Nath** — DISCUSSÃO E CONFIRMAÇÃO DE ALGUMAS ESPÉCIES DO GÊNERO ANASTREPHA (DIPT-TRYPETIDAE).
Discussion and confirmation of certain species of Anastrepha 31-38

5. **Guida, V. O.** — MÉTODO PARA ESTUDO DA SENSIBILIDADE DOS ANAERÓBIOS AOS ANTIBIÓTICOS EM CULTURA DE SUPERFICIE. Estampas 4 e 5.
A method for studying the effect of antibiotics on anaerobes in surface cultures 39-42

6. **Nóbrega, P., E. Trapp** e **M. Giovannoni** — TOXOPLASMOSE ESPONTÂNEA DE GALINHA. Estampas 6 e 7.
Spontaneous toxoplasmosis in the domestic fowl 43-49

7. **Guida, V. O.** — ANTAGONISMO "IN VITRO" DE MICROORGANISMOS SAPRÓFITAS DO SÓLO (BACTÉRIAS, FUNGOS E ACTINOMICETOS) SÔBRE O B. ANTHRACIS. Estampa 8.
Antagonistic action of saprophytic microorganisms from the soil on B. Anthracis 51-56

(CONTINUA)

Pags.

8. **Guida, V. O.** — ANTAGONISMO "IN VITRO" DE MICROORGANISMOS SAPRÓFITAS DO SOLO (BACTÉRIAS, FUNGOS E ACTINOMICETOS) SÔBRE CLOSTRIDIA. Estampas 9, 10 e 11.
Antagonistic action of saprophytic microorganisms from the soil on anaerobic bacteria (Clostridia) 57-66

9. **Bitancourt, A. A.** e **A. E. Jenkins** — ESTUDOS SÔBRE AS MIRIANGIALES — V. ELSINOACEAS DA COSTA DO MARFIM (AFRICA OCIDENTAL FRANCESA) — Estampas 12 e 13.
Études sur les Myriangiales — V. Elsinoacées de la Côte d'Ivoire (A. O. F.) 67-77

10. **Wallace, G. B., A. E. Jenkins** e **A. A. Bitancourt** — ESTUDOS SÔBRE AS MIRIANGIALES — VI. VERRUGOSE DO MAMOEIRO, CAUSADA POR SPHACELOMA — Estampas 14 e 15.
Studies in the Myriangiales — VI. Papaw Scab, caused by Sphaceloma 79-86

11. **Caldas, A. D., L. P. Machado** e **N. Planet** — O TESTE DE FIXAÇÃO EM SUPERFÍCIE DE CASTAÑEDA, PARA O DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE. OBSERVAÇÕES SÔBRE SUA EXECUÇÃO E LEITURA.
Surface fixation method of Castañeda for the diagnosis of brucellosis. Observations about its execution and reading . . . 87-92

12. **Schwarz, K., R. Dierberger** e **A. A. Bitancourt** — ESTUDOS SÔBRE O CÂNCER VEGETAL — I. A NATUREZA QUÍMICA DAS AUXINAS DE ALGUNS TECIDOS VEGETAIS NORMAIS E TUMORAIS — Com 5 figuras no texto e estampa 16.
Studies in plant cancer — I. Chemical identity of the auxins of some normal and tumor plant tissues 93-118

13. **Reis, J.** e **P. Nóbrega** com a colaboração de **R. C. Bueno, A. S. Reis** e **M. Giovannoni** — DOENÇAS DE AVES EM S. PAULO. ANÁLISES DE 17.753 CASOS — Com 14 figuras e 6 tabelas no texto.
An analysis of 17,753 cases of avian diseases in São Paulo . . 119-160

14. **Bitancourt, A. A.** — ESTUDOS SÔBRE A LEPROSE DOS CITRUS — I. DISTRIBUIÇÃO GEOGRAFICA E SINTOMATOLOGIA — Estampas 17-23.
Studies on the "Leprosis" disease of citrus — I. Geographical distribution and symptoms 161-184

15. **Bitancourt, A. A.** — ESTUDOS SÔBRE A LEPROSE DOS CITRUS — II. TRANSMISSÃO NATURAL ÀS FOLHAS.
Studies on the "Leprosis" disease of citrus — II. Natural transmission to the leaves 185-203

(CONTINUA)

Pags.

16. **Bitancourt, A. A.** — ESTUDOS SÔBRE A LEPROSE DOS CITRUS — III. TRANSMISSÃO NATURAL ÀS FRUTAS — Estampas 24, 25 e 26.
Studies on the "Leprosis" disease of citrus — III. Natural transmission to the fruits 205-218

17. **Bitancourt, A. A.** — ESTUDOS SÔBRE A LEPROSE DOS CITRUS — IV. EXPERIENCIAS DE TRATAMENTO — Estampa 27.
Studies on the "Leprosis" disease of citrus — IV. Control experiments 219-231

18. **Castro, M. P.** — DIVISÃO MULTIPLA DE TOXOPLASMA EM CULTURA DE TECIDOS — Estampas 28 e 29.
Multiple division of toxoplasma in tissue culture 233-241

19. **Caldas, A. D., L. J. P. Machado** — EMPRÊGO DA PROVA DA FIXAÇÃO EM SUPERFÍCIE DE CASTAÑEDA NO DIAGNOSTICO DA BRUCELOSE SUINA.
Surface fixation method (Castañeda) for diagnosis of swine brucellosis 243-247

———×———

Vol. 22 — Artigo 1 Maio de 1955

ESTUDOS DA AÇÃO DE MODERNOS INSETICIDAS ORGÂNICOS SÔBRE A "LAGARTA DOS MILHARAIS" LAPHYGMA FRUGIPERDA (ABBOT & SMITH, 1797) EM MILHO. (Lepidoptera, Noctuidae) (1)

POR

Leão Leiderman

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Sob a denominação comum de "lagarta dos milharais" designa-se, em São Paulo, uma das principais pragas das gramíneas, o noctuídeo *Laphygma frugiperda*, que causa frequentemente sérios prejuízos às culturas de milho e arroz, bem como às pastagens.

A Secção de Entomologia Agrícola do Instituto Biológico iniciou em 1953 uma série de ensaios visando conhecer a eficácia de alguns dos modernos inseticidas orgânicos no combate às lagartas que se instalam nos "cartucho" do milho. Em trabalho já publicado (2) foram descritos os resultados obtidos. Nesses experimentos preliminares foram feitas três aplicações, a intervalos quinzenais, de polvilhamentos e pulverizações, a primeira das quais quando as plantas atingiam mais ou menos 15 cm. de altura.

As observações mostraram que os tratamentos mais promissores foram pulverizações com 0,50 a 1% DDT, 0,06 a 0,08% Endrin ou 0,04 a 0,08% Parathion e polvilhamentos com 5 a 10%DDT, 1% Parathion, 10% Metoxiclór ou 10% Clordane. A maior parte dos inseticidas, tanto em pulverizações como em polvilhamentos, foi empregada nas concentrações geralmente recomendadas. No decurso dos ensaios, pareceu-nos que alguns inseticidas talvez pudessem dar resultados mais evidentes se empregados em maiores concentrações de princípio ativo.

Assim, nos últimos meses de 1953 reiniciámos os experimentos de campo, usando os produtos em concentrações mais elevadas. Visámos nesse trabalho observar não só a sua ação como também o poder residual até o 20.º dia após a aplicação contra as lagartas.

---

(1) Trabalho apresentado ao Segundo Congresso Panamericano de Agronomia, reunido em Abril de 1954 em Águas de São Pedro, Estado de São Paulo.

(2) Leiderman, L. e Sauer, H. F. G. — 1954 — Ação de alguns inseticidas orgânicos sôbre **Laphygma frugiperda** (Abbot & Smith, 1797) atacando milho. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, 21:111-119, 4 tabelas, 15 referências.

MÉTODO E MATERIAL USADOS

No período compreendido entre Setembro e Novembro foram instalados, na Fazenda Experimental Mato Dentro, em Campinas, sete campos experimentais com milho da variedade "Armour". Em seis dêsses campos o delineamento estatístico empregado foi o de blocos incompletos do tipo "Lattice balanceado 3×3", compreendendo nove tratamentos, inclusive a testemunha, repetidos quatro vezes, concernindo cada repetição a três blocos com três tratamentos (parcelas) cada um. Um único campo (campo II) foi delineado em blocos repetidos ao acaso cinco vezes, com 12 tratamentos, inclusive duas testemunhas, por bloco.

As contagens foram feitas considerando-se 20 plantas das duas ruas centrais das parcelas e abrangeram o período compreendido entre Outubro e Dezembro. Antes da aplicação dos tratamentos e no quinto e vigésimo dia após essa aplicação, foram anotadas as plantas que tinham lagartas vivas. Uma só aplicação de inseticida foi feita quando as plantas tinham de 15 a 25 cm. de altura.

O estudo dos resultados se processou pela transformação dos dados obtidos em porcentagens, que por sua vez foram transformadas em ângulos segundo a fórmula: Ângulo = Arco seno $\sqrt{\text{Porcentagem}}$, a fim de possibilitar exame estatístico, que foi feito pelo método da análise de variância. As porcentagens de eficácia foram obtidas pela aplicação da fórmula

$$C = \frac{AB1 - A1B}{AB1} \times 100$$ onde

C = Porcentagem de eficácia
A = Infestação inicial no tratamento
A1 = Infestação final no tratamento
B = Infestação inicial da testemunha
B1 = Infestação final da testemunha

semelhante à fórmula recomendada por Swingle & Snapp (1).

Usaram-se ao todo dez inseticidas, oito dos quais foram empregados na forma de pulverizações e de polvilhamentos, e dois: Endrin e Isodrin, em pulverizações apenas. Nos polvilhamentos foram empregados 2% Aldrin, 5 e 10% Clordane, 5 e 10% DDT, 2% Dieldrin e 1 e 2% Lindane, 5 e 10% Metoxiclór, 1e 2% Parathion e 10% Toxa-

(1) Swingle, H. S. e Snapp, O. I. — 1931 — Petroleum oils and oil emulsions as insecticides, and their use against the San José Scale on peach trees in the South. U. S. Dept. Agr. Techn. Bull. 253, Washington, U. S. A.

feno. Nas pulverizações foram empregados 0,06 e 0,08% Aldrin, 0,30, 0,40 e 0,50% Clordane, 0,30, 0,40 e 0,50% DDT, 0,06, 0,08 e 0,10% Dieldrin, 0,06, 0,08 e 0,10% Endrin, 0,06 e 0,08% Isodrin, 0,06, 0,08 e 0,10% Lindane, 0,40 e 0,50 Metoxiclór, 0,06, 0,08 e 0,10% Parathion e 0,40 e 0,50 Toxafeno.

Tabela 1 — Resultados de pulverizações aplicadas ao campo I. Plantio — 8 Setembro. Tratamento — 13 Outubro. Infestação geral média 69,4%. Campinas, 1953.

TRATAMENTO	Infestação					Porcentagem de eficácia	
	Porcentagem inicial	No 5.º dia		No 20.º dia		No 5.º dia	No 20.º dia
		Porcentagem	Média Angular	Porcentagem	Média Angular		
0,10% Endrin ...	70,0	3,7	7,8	5,0	11,0	95,6	91,7
0,10% Parathion .	60,0	6,2	12,4	13,7	18,9	91,4	73,4
0,10% Dieldrin ..	76,2	8,7	14,5	18,7	18,9	90,6	71,5
0,10% Lindane ..	75,0	8,7	14,5	20,0	25,2	90,4	69,1
0,50% Toxafeno .	72,5	8,7	14,6	13,7	21,7	90,1	78,0
0,50% Clordane ..	72,5	11,2	19,1	11,2	18,8	87,2	82,0
0,50% Metoxiclór .	70,0	17,5	24,0	31,2	33,7	79,4	48,2
0,50% DDT	65,0	17,5	24,0	11,2	19,5	77,8	79,9
Testemunha	63,7	77,5	65,3	55,0	47,3		
Diferença mínima signif. Nível 5% .			15,1		15,7		
Nível 1% .			20,5		21,3		

Nas pulverizações, com excepção do Endrin, foram usados pós molháveis, sendo as seguintes as concentrações, em princípio ativo, dos produtos comerciais: Aldrin 40%, Clordane 40%, DDT 50%, Dieldrin 50%, Endrin 18,5% concentrado emulsionável, Isodrin 25%, Lindane 16%, Metoxiclór 50%, Parathion 10% e Toxafeno 40%. Os pós para polvilhamentos foram preparados a partir dos pós molháveis.

Nos polvilhamentos, aplicados com polvilhadeira manual do tipo de ventoinha, empregaram-se 20 Kg. de pó por hectare, enquanto nas pulverizações para as quais se usou pulverizador de costas, aplicaram-se 450 litros por hectare.

RESULTADOS

Campo I — Todos os tratamentos diferiram de modo altamente significativo da testemunha, no 5.º dia, como se pode observar na tabela 1. Não houve diferença estatística entre 0,10% Endrin, 0,10%

Parathion, 0,10% Dieldrin, 0,10% Lindane, 0,50% Toxafeno e 0,50% Clordane. Sòmente 0,10% Endrin diferiu significativamente de 0,50% Metoxiclór e 0,50% DDT. No 20.º dia, todos os tratamentos, com excepção de 0,50% Metoxiclór, diferiram da testemunha de maneira altamente significativa. Não houve diferença significativa entre êsses tratamentos. 0,10% Endrin e 0,50% Metoxiclór diferiram de modo significativo.

No campo I, que teve uma infestação geral média de 69,4%, sòmente 0,10% Endrin deu combate acima de 90% no 20.º dia. Além desse inseticida, 0,10% Parathion, 0,10% Dieldrin, 0,10% Lindane e 0,50% Toxafeno atingiram essa porcentagem no 5.º dia.

Tabela 2 — Resultados de pulverizações aplicadas ao campo II. Plantio — 22 Outubro. Tratamento — 8 Dezembro. Infestação geral média — 43,9%. Campinas, 1953.

TRATAMENTO	Porcentagem de infestação			Porcentagem de eficácia	
	Inicial	No 5.º dia	No 20.º dia	No 5.º dia	No 20.º dia
0,08% Isodrin ...	60,0	0	0	100,0	100,0
0,08% Endrin ...	48,0	0	1,0	100,0	97,7
0,40% DDT	38,0	0	1,0	100,0	97,0
0,40% Clordane ..	41,0	0	3,0	100,0	91,8
0,08% Parathion .	49,0	1,0	3,0	97,8	93,1
0,08% Aldrin	40,0	1,0	2,0	97,3	94,4
0,08% Lindane ..	38,0	1,0	2,0	97,1	94,1
0,40% Metoxiclór.	36,0	1,0	3,0	97,0	90,6
0,40% Toxafeno .	50,0	2,0	1,0	95,6	97,7
0,08% Dieldrin ..	46,0	2,0	5,0	95,3	87,8
Testemunha	37,0	34,0	33,0		

Campo II — Para uma infestação geral média de 43,9%, 0,08% Isodrin, 0,08% Endrin, 0,40% DDT, 0,40% Clordane, 0,08% Parathion, 0,08% Aldrin, 0,08% Lindane, 0,40% Metoxiclór e 0,40% Toxafeno controlaram acima de 90% o ataque no 20.º dia; 0,08% Dieldrin também o fez, porém no 5.º dia.

Tabela 3 — Resultados de pulverizações aplicadas no campo III. Plantio — 8 Outubro. Tratamento — 17 Novembro. Infestação geral média — 29,1%. Campinas, 1953.

TRATAMENTO	Porcentagem de infestação			Porcentagem de eficácia	
	Inicial	No 5.º dia	No 20.º dia	No 5.º dia	No 20.º dia
0,08% Endrin ...	28,7	0	0	100,0	100,0
0,08% Parathion .	33,7	0	8,7	100,0	76,2
0,08% Dieldrin ..	28,7	0	0	100,0	100,0
0,08% Lindane ..	25,0	0	2,5	100,0	90,8
0,40% Toxafeno .	32,5	0	0	100,0	100,0
0,40% Clordane ..	26,2	0	0	100,0	100,0
0,40% Metoxiclór .	33,7	0	0	100,0	100,0
0,40% DDT	26,2	0	0	100,0	100,0
Testemunha	27,5	32,5	30,0		

Campo III — Neste campo a infestação geral média foi baixa, 29,1%, tendo todos os tratamentos, inclusive 0,08% Dieldrin, dado excelente combate às lagartas até o 20.º dia.

Tabela 4 — Resultados de pulverizações aplicadas no campo IV. Plantio — 18 Novembro. Tratamento — 15 Dezembro. Infestação geral média, 49,7%. Campinas, 1953.

TRATAMENTO	Porcentagem de infestação			Porcentagem de eficácia	
	Inicial	No 5.º dia	No 20.º dia	No 5.º dia	No 20.º dia
0,06% Dieldrin ..	50,0	0	6,2	100,0	83,1
0,06% Endrin ...	53,7	1,2	1,2	97,3	96,8
0,06% Aldrin ...	55,0	1,2	3,7	97,3	90,8
0,06% Parathion .	46,2	1,2	3,7	96,8	89,0
0,30% DDT	45,0	1,2	8,7	96,7	73,6
0,30% Clordane .	46,2	2,5	5,0	93,7	85,3
0,06% Isodrin ..	47,5	5,0	5,0	87,7	85,7
0,06% Lindane ..	51,2	10,0	3,7	77,2	90,1
Testemunha	52,5	45,0	38,7		

Campo IV — Pela inspecção da tabela 4, observa-se ter havido eficácia acima de 90% no 20.º dia por parte de 0,06% Endrin, 0,06% Aldrin e 0,06% Lindane, sendo que 0,06% Parathion deu 89,0% de efi-

cácia. 0,06% Dieldrin, 0,06% Parathion, 0,30% DDT e 0,30% Clordane tiveram eficácia acima de 90% no 5.º dia. A infestação geral média neste campo foi 49,7%.

Tabela 5 — Resultados de polvilhamentos aplicados no campo V. Plantio — 8 Setembro. Tratamento — 13 Outubro. Infestação geral média, 65,8%. Campinas, 1953.

TRATAMENTO	Infestação					Porcentagem de eficácia	
	Porcentagem inicial	No 5.º dia		No 20.º dia		No 5.º dia	No 20.º dia
		Porcentagem	Média Angular	Porcentagem	Média Angular		
2% Parathion ..	63,7	3,7	7,8	17,5	22,7	94,9	78,7
2% Aldrin	63,7	7,5	10,7	25,0	27,1	89,9	69,6
10% Clordane ...	65,0	11,2	19,5	23,7	29,1	85,2	71,7
2% Lindane ...	60,0	13,7	19,0	27,5	29,8	80,3	64,5
10% Toxafeno ..	66,2	16,2	22,8	13,7	20,7	79,0	83,9
10% DDT	78,7	20,0	25,8	35,0	37,3	78,2	65,6
10% Metoxiclór .	68,7	28,7	31,7	27,5	34,0	64,1	69,0
2% Dieldrin ...	66,2	35,0	36,2	38,7	38,9	54,7	54,7
Testemunha	60,0	70,0	56,9	77,5	59,7		
Diferença mínima signif. Nível 5% .			13,7		12,7		
Nível 1% .			18,6		16,5		

Campo V — A tabela 5, que corresponde a polvilhamentos aplicados em um campo onde a infestação geral média era de 65,8%, mostra diferenças altamente significativas entre todos os tratamentos e a testemunha, no 5.º dia. Não houve diferença significativa entre 2% Parathion, 2% Aldrin, 10% Clordane e 2% Lindane. O tratamento 2% Parathion diferiu significativamente de 10% Toxafeno e 10% DDT e de modo altamente significativo de 10% Metoxiclór e 2% Dieldrin.

2% Aldrin diferiu significantemente de 10% DDT e de maneira altamente significativa de 10% Metoxiclór e 2% Dieldrin. Os tratamentos 10% Clordane e 2% Lindane apresentam diferença significativa em relação a 2% Dieldrin.

No 20.º dia, todos os tratamentos diferiram de modo altamente significativo, da testemunha. 10% Toxafeno apresentou diferença altamente significativa em relação a 2% Dieldrin e 10% DDT e apenas significativa em relação a 10% Metoxiclór. O polvilhamento com 2% Parathion diferiu significantemente de 2% Dieldrin e 10% DDT.

Com referência à porcentagem de eficácia nenhum dos tratamentos ultrapassou 90% no 20.º dia. Para uma infestação geral média de 65,8%, apenas 2% Parathion e 2% Aldrin conseguiram alcançar essa porcentagem no 5.º dia.

Tabela 6 — Resultados de polvilhamentos aplicados ao campo VI. Plantio — 22 Outubro. Tratamento — 9 Dezembro. Infestação geral média, 38,0%. Campinas, 1953.

TRATAMENTO	Infestação					Porcentagem de eficácia	
	Porcentagem inicial	No 5.º dia		No 20.º dia		No 5.º dia	No 20.º dia
		Porcentagem	Média Angular	Porcentagem	Média Angular		
10% Metoxiclór .	32,5	1,2	3,2	23,7	28,7	97,2	52,4
10% Clordane ...	37,5	2,5	6,4	12,5	20,2	95,2	78,3
10% Toxafeno ..	33,7	2,5	4,6	15,0	22,1	94,7	71,0
2% Parathion ..	47,5	5,0	9,2	11,2	19,2	92,4	84,6
2% Dieldrin ...	41,2	6,2	14,2	16,2	23,1	89,1	74,3
10% DDT	28,7	7,5	13,5	13,7	21,3	81,3	68,8
2% Aldrin	41,2	12,5	20,3	21,2	27,3	78,2	66,4
2% Lindane	45,0	13,7	21,2	17,5	24,1	78,1	74,7
Testemunha	35,0	48,7	44,2	53,7	47,2		
Diferença mínima signif. Nível 5% .			11,3		9,0		
Nível 1% .			15,3		12,2		

Campo VI — Para as contagens realizadas 5 dias após a aplicação dos inseticidas, todos os tratamentos diferiram de modo altamente significativo da testemunha. Não houve diferença significativa entre 10% Metoxiclór, 10% Clordane, 10% Toxafeno, 2% Parathion, 2% Dieldrin e 10% DDT. Os tratamentos 10% Metoxiclór e 10% Toxafeno diferiram de modo altamente significativo de 2% Aldrin e 2% Lindane. 10% Clordane apresentou diferença significativa em relação a 2% Aldrin e 2% Lindane; o mesmo aconteceu com 2% Parathion em relação a 2% Lindane.

Também no 20.º dia todos os tratamentos diferiram de modo altamente significativo da testemunha. Com excepção de 10% Metoxiclór os inseticidas não apresentaram diferença significativa entre si. 2% Parathion diferiu significantemente de 10% Metoxiclór.

No 20.º dia após a aplicação dos inseticidas, para uma infestação geral média de 38,0%, nenhum dos tratamentos deu porcentagem de

eficácia acima de 90%. Já para o 5.º dia, 10% Metoxiclór, 10% Clordane, 10% Toxafeno e 2% Parathion atingiram essa porcentagem.

Tabela 7 — Resultados de polvilhamentos aplicados ao campo VII. Plantio — 18 Novembro. Tratamento — 15 Dezembro. Infestação geral média, 43,2%. Campinas, 1953.

TRATAMENTO	Infestação					Porcentagem de eficácia	
		No 5.º dia		No 20.º dia			
	Porcentagem inicial	Porcentagem	Média Angular	Porcentagem	Média Angular	No 5.º dia	No 20.º dia
2% Dieldrin ...	41,2	1,2	3,2	8,7	16,0	97,1	78,1
10% Toxafeno ..	40,0	1,2	3,2	0,0	0,0	97,0	100,0
1% Parathion ..	52,5	2,5	6,4	2,5	7,1	95,5	95,1
5% Clordane ...	47,5	5,0	11,0	6,2	12,0	90,1	86,4
1% Lindane ...	30,0	3,7	9,7	1,2	4,5	88,2	95,7
2% Aldrin	56,2	7,5	15,6	7,5	12,7	87,5	86,2
5% DDT	37,5	5,0	11,0	8,7	14,7	87,5	75,9
5% Metoxiclór .	45,0	8,7	14,5	5,0	10,8	81,7	88,5
Testemunha	38,7	41,2	39,9	37,5	38,0		
Diferença mínima signif. Nível 5% .			11,0		11,3		
Nível 1% .			15,0		15,6		

Campo VII — Para uma infestação geral média, 43,2%, observou-se, conforme a tabela 7, que apesar de diferirem de modo altamente significativo da testemunha no 5.º dia, os tratamentos não apresentaram diferença altamente significativa entre si. Os polvilhamentos 2% Dieldrin e 10% Toxafeno diferiram significantemente de 5% Metoxiclór e 2% Aldrin.

Vinte dias após a aplicação dos pós verificou-se existência de diferenças altamente significativas entre todos os tratamentos e a testemunha. O tratamento 10% Toxafeno deu diferença altamente significativa de 2% Dieldrin. Não houve diferença significativa entre 10% Toxafeno, 1% Lindane, 1% Parathion e 5% Metoxiclór e nem altamente significativa entre 10% Toxafeno, 1% Lindane, 1% Parathion, 5% Metoxiclór, 5% Clordane, 2% Aldrin e 5% DDT.

Com referência à porcentagem de eficácia observou-se que 10% Toxafeno, 1% Parathion e 1% Lindane deram contrôle acima de 90% no 20.º dia, enquanto 2% Dieldrin e 5% Clordane atingiram essa porcentagem no 5.º dia.

DISCUSSÃO

Passaremos a analisar as porcentagens de eficácia dos diversos inseticidas, tanto em pulverizações como polvilhamentos, considerando de preferência os casos em que as infestações nas parcelas giravam entre 40 e 60%, antes da aplicação dos tratamentos. Teremos, assim, uma melhor visão da ação dos tóxicos, o que facilitará o estudo comparativo entre todos os inseticidas usados.

Aldrin

Em um campo onde a infestação inicial era de 55,0% a pulverização a 0,06% produziu uma eficácia de 90,8% no 20.º dia. Quando empregado em polvilhamento a 2% não atingiu em nenhum campo uma eficácia acima de 90,0% nem no 5.º dia.

Clordane

Para uma infestação inicial de 46,2%, a pulverização de 0,30% apresentou eficácia de 93,7% e 85,3% no 5.º e 20.º dias, respectivamente. Em outro campo, o polvilhamento a 5% deu 90,1% e 86,4% de eficácia, respectivamente no 5.º e 20.º dias após a sua aplicação, sendo a infestação inicial de 47,5%.

DDT

Quando empregado em pulverizações a 0,30% produziu 96,7% e 73,6% de eficácia no 5.º e 20.º dias, para uma infestação inicial de 45,0%. Em um campo com infestação elevada, 78,7%, o polvilhamento a 10% não atingiu a 90% de eficácia nem no 5.º nem no 20.º dia após a aplicação do inseticida.

Dieldrin

Para uma infestação inicial de 50,0% a pulverização a 0,06% teve eficácia de 100,0% cinco dias após o tratamento e 83,1% no 20.º dia. Polvilhamentos a 2% deram resultados diferentes. Para uma infestação inicial de 41,2% houve eficácia acima de 90% no 5.º dia e abaixo dessa porcentagem no 20.º dia; para uma infestação inicial de 66,2%, o contrôle desejado, de 90%, não foi atingido nem no 5.º nem no 20.º dia após a aplicação dos polvilhamentos.

Endrin

Êsse foi dos melhores inseticidas testados. Pulverizações a 0,06% tiveram excelente eficácia: 97,3% e 96,8% no 5.º e 20.º dia, respectivamente, para uma infestação inicial de 53,7%.

Isodrin

A 0,08% teve eficácia de 100% até o 20.º dia, para uma infestação inicial de 60,0%. A 0,60%, para uma infestação menor, 47,5%, as porcentagens de eficácia atingiram apenas a 87,7% e 85,7% para 5 e 20 dias após o tratamento.

Lindane

Para uma infestação inicial de 51,2% teve 90,1% de eficácia no 20.º dia em pulverização a 0,06%. Entretanto, para uma infestação elevada, 75,0%, e em concentração a 0,10%, revelou sòmente 69,1% de eficácia no 20.º dia. Polvilhamentos a 1% deram contrôle apreciável no 20.º dia, para infestações moderadas, de 30,0%, o mesmo não acontecendo todavia em infestações mais elevadas, como de 60,0%, em que não atingiu a 90% de eficácia nem no 5.º nem no 20.º dia, mesmo sendo usado a 2%.

Metoxiclór

A 0,40% em pulverização teve eficácia acima de 90% no 20.º dia, para infestações moderadas de 36,0%. A 0,50% e em infestação elevada, 70,0% não combateu eficientemente as lagartas. Polvilhamentos a 10% tiveram acima de 90% de eficácia numa infestação de 32,5% apenas até o 5.º dia. Numa infestação mais elevada, 68,7%, não deu resultado apreciável.

Parathion

A pulverização a 0,06% mostrou apreciável eficácia no 20.º dia após o tratamento, sendo a infestação inicial de 46,2%. O polvilhamento a 1% deu excelente resultado numa infestação inicial de 52,5%. O Parathion demonstrou ser um dos melhores inseticidas para *Laphygma.*

Toxafeno

Quando usado em pulverização a 0,40% deu resultado muito bom no 20.º dia após a aplicação, para uma infestação inicial de 50,0%. Sob a forma de polvilhamento a 10% também seus resultados foram bons, porquanto se obteve 100% de eficiência para uma infestação inicial de 40,0% e 83,9% em outro campo, cuja infestação era de 66,2%, em ambos os casos para contagens feitas no 20.º dia após a aplicação dos pós.

FITOTOXICIDADE

Alguns inseticidas produziram leves "queimaduras" em algumas plantas, principalmente nas fôlhas mais novas do "cartucho". No entanto, tais "queimaduras", que em alguns casos não passavam de manchas e estrias cloróticas, ao que pudemos observar, quase não tiveram efeito prejudicial no desenvolvimento das plantas, que floresceram e espigaram normalmente.

Ação fitotóxica mais pronunciada foi observada em tratamentos em que foram aplicadas pulverizações contendo 0,06% Endrin, 0,08% Isodrin e 0,40% Toxafeno, principalmente o primeiro desses inseticidas. As pulverizações de 0,30% Clordane, 0,40% Metoxiclór, 0,30% DDT, 0,06% Aldrin, 0,06% Dieldrin e 0,06% Lindane também produziram clorose, porém menos acentuada.

O mesmo fato se deu com alguns inseticidas quando empregados sob a forma de polvilhamento. Foram observadas "queimaduras" em algumas plantas tratadas com 2% Aldrin, 2% Dieldrin, 2% Lindane, 10% Toxafeno, 10% DDT, 10% Metoxiclór e 10% Clordane.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciaram nas pulverizações o Aldrin, Endrin, Isodrin, Parathion e Toxafeno com uma eficácia superior a 90% no 20.º dia após as aplicações, no combate da "lagarta dos milharais".

Clordane, DDT, Dieldrin, Lindane e Metoxiclór, também em pulverizações, produziram o mesmo efeito até o 5.º dia após os tratamentos.

Para os polvilhamentos os resultados verificados com Parathion, Toxafeno, Clordane, Dieldrin e Metoxiclór foram idênticos às pulverizações com os mesmos produtos.

STUDIES ON THE ACTION OF THE NEWER ORGANIC INSECTICIDES ON THE "FALL ARMYWORM" *LAPHYGMA FRUGIPERDA* (ABBOT & SMITH, 1797) IN CORN

Abstract

This paper report preliminary results obtained on field experiments, carried out in 1953 at Campinas, State of São Paulo, by the Secção de Entomologia Agricola of the Instituto Biologico to determine the control of the "Fall armyworm" Laphygma frugiperda, damaging corn of the "Armour" variety.

Ten modern organic insecticides were applied, eight of them being used as sprays and dusts, and 2 as sprays only. The only one application of the insecticides was done when the plants were 15-25 cm. high.

Counts of the plants with living worms were performed before as well as five and twenty days after the treatment.

The observations revealed that from the sprays tested, 0.06 per cent Aldrin, 0.06 per cent Endrin, 0.08 per cent Isodrin, 0.06 per cent Parathion and 0.04 per cent Toxaphene were the insectecides whose control rated more than 90 per cent on the twenty day. The dusts with 1 per cent Parathion or 10 per cent Toxaphene presented also the same results.

Fitotoxic action of the insecticides on the plants were observed.

———o———

Vol. 22 — Artigo 2 Maio de 1955

O COMBATE DAS LAGARTAS DE *HELIOTHIS OBSOLETA* (FABR., 1793) (1) (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE) EM ESPIGAS DE MILHO COM MODERNOS INSETICIDAS ORGÂNICOS

POR

Leão Leiderman

Do Instituto Biológico de S. Paulo

INTRODUÇÃO

Entre os insetos que causam danos ao milho, no campo, destaca-se, pela importância dos prejuizos causados às espigas, a lagarta do noctuideo *Heliothis obsoleta,* conhecida como "lagarta das espigas de milho". A Secção de Entomologia Agricola do Instituto Biológico vem há tempo cuidando do combate dessa praga. Em 1942 (2) foi publicado um trabalho em que eram abordados os seus hábitos e os meios de a combater, mediante a eliminação dos estiletes-estigmas.

Em fins de 1952 iniciámos trabalhos a fim de estudar as possibilidades de aplicarem nesse combate alguns modernos inseticidas orgânicos. Ante os resultados dos ensaios preliminares dados à divulgação (3), sobressaem como das mais promissoras as pulverizações com DDT, conjuntamente com óleo mineral branco emulsionável que funciona como agente de penetração nos canais dos estiletes-estigmas ("bonecas").

Esses estudos tiveram continuação em fins de 1953, visando então comparar a ação de diversos inseticidas e algumas ovicidas, em concentrações equivalentes à do DDT.

Também foi estudada a concentração de óleo mineral branco, sendo ainda observada a ação de pós molháveis e de concentrados emulsionáveis de alguns inseticidas, a fim de verificar possíveis diferenças de toxicidez às lagartas.

---

(1) Trabalho apresentado ao Segundo Congresso Panamericano de Agronomia, reunido em Abril de 1954, em Águas de São Pedro, Estado de São Paulo. Os estudos aqui relatados foram executados de acôrdo com o Plano de Trabalho N.º 18 da Secção de Entomologia Agrícola do Instituto Biológico.

(2) A. Orlando — 1942 — Observações dos hábitos de **"Heliothis obsoleta (Fabr.)"** como praga das espigas de milho, e a eliminação dos estilos estigmas como processo de combate (Lep., Noct.). Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, 13: 191-206, 4 figuras, 9 referências.

(3) L. Leiderman e H. F. G. Sauer — 1954 — Resultados preliminares da ação de inseticidas orgânicos no combate a *Heliothis obsoleta* (Fabr., 1793) em espigas de milho. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, 21: 101-110, 3 tabelas, 28 referências.

MÉTODO E MATERIAL USADOS

Oito experimentos de campo, com milho da variedade "dôce 1276 APC", fornecido pelo Instituto Agronômico de Campinas, foram instalados nos campos experimentais da Secção de Entomologia Agricola do Instituto Biológico, com séde em Campinas.

Em todos esses campos, com excepção dos N.os 2 e 6, as espigas receberam quatro pulverizações, a intervalos de tres dias, as quais se iniciaram quando as plantas apresentavam cêrca de 10% de espigamento ("bonecas"). Os campos 2 e 6, em que foram testados ovicidas, receberam cinco pulverizações nas mesmas condições. A aplicação das pulverizações foi feita nos meses de Novembro de 1953 (campo 3), Dezembro (campo 4), Janeiro de 1954 (campo 5), Fevereiro (campo 7) e Março (campos 1, 2, 6 e 8).

Na execução dos trabalhos foram empregados pulverizadores de costas, com bicos comuns, gastando-se em média 600 litros por hectare.

Os inseticidas pulverizados continham as seguintes porcentagens de principio ativo: DDT — 0,30, 0,40, 0,60 e 0,75; Metoxiclór e Toxafeno — 0,60 e 0,75; Clordane — 0,75; Aldrin, Dieldrin e Endrin — 0,05, 0,06, 0,08 e 0,10; Parathion e Isodrin — 0,08 e 0,10; Lindane — 0,10;%. Os ovicidas foram usados nas seguintes porcentagens: Sulfato de Nicotina e Sulfenoma — 0,15; Aramite, 2,4 Dinitro orto fenol, DN — 111, EPN 300, Metacide e Ovotran — 0,05.

Dos produtos testados, alguns foram usados na forma de pós molháveis; outros, na de concentrados emulsionáveis; alguns deles eram produtos técnicos. As porcentagens de principio ativo nos pós molháveis foram : DDT, Dieldrin, Metoxiclór e Ovotran — 50%; Aldrin, Clordane, Toxafeno e Sulfenona — 40%; EPN-300 e Isodrin — 25%; DN-111 — 20%; Lindane — 16%; Aramite 15% e Parathion — 10%. As porcentagens dos concentrados emulsionáveis foram: DDT e Aldrin —25%, Dieldrin e Endrin — 18,5% e Sulfato de Nicotina — 40%. Metacide e 2,4 Dinitro orto fenol foram usados na forma de produtos técnicos, o primeiro a 30,6% e o último a 80%.

O óleo mineral branco emulsionável empregado nos diversos experimentos a 5 e 10%, foi o produto conhecido como Citról ou Citro-Mulsion.

O delineamento estatistico usado para os campos 2 a 8 foi o de blocos incompletos balanceados do tipo "Lattice 3x3", que compreendia nove tratamentos, inclusive a testemunha, repetidos quatro vezes, concernindo cada repetição a três blocos, com três tratamentos (par-

celas) cada um. No campo 1 foi empregado o delineamento de blocos repetidos ao acaso, quatro vezes, contendo cada bloco onze tratamentos, inclusive a testemunha. Em todos os campos as parcelas compreendiam quatro ruas de dois metros de comprimento.

TABELA 1

Infestação de *Heliothis obsoleta* em um campo onde foram aplicadas pulverizações de inseticidas sem óleo emulsionável. Campinas, 1954.

TRATAMENTOS	Espigas Atacadas			Espigas com lagartas vivas		
	Porcentagem	Média Angular	Porcentagem de eficácia	Porcentagem	Média Angular	Porcentagem de eficácia
0,75% DDT	12,5	19,7	81,8	11,2	18,8	83,4
0,10% Endrin	27,5	31,4	60,0	26,2	30,6	61,2
0,10% Isodrin	36,2	36,9	47,3	35,0	36,1	48,1
0,75% Clordane	38,7	38,4	43,7	36,2	37,0	46,4
0,10% Parathion	42,5	40,6	38,1	38,7	38,4	42,7
0,10% Dieldrin	45,0	42,0	34,5	42,5	40,5	37,0
0,10% Aldrin	48,7	44,1	29,1	45,0	41,8	33,3
0,75% Metoxiclór	51,2	45,8	25,5	48,7	44,3	27,8
0,10% Lindane	57,5	49,8	16,3	56,2	49,0	16,7
0,10% BHC	62,5	52,3	9,0	53,7	47,2	20,4
Testemunha	68,7	58,9		67,5	58,1	
Dif. Min. Signif. Nivel 5%		14,5			15,0	
Dif. Min. Signif. Nivel 1%		19,5			20,2	

Todas as contagens foram feitas cêrca de 15 dias após a última pulverização, sendo colhidas e examinadas 20 espigas das duas ruas centrais de cada parcela. O estudo dos resultados se processou pela transformação dos dados obtidos em porcentagens, as quais por sua vez foram transformadas em ângulos segundo a fórmula de Bliss (1) Ângulo = arco seno $\sqrt{\text{porcentagem}}$, a fim de possibilitar melhor exame estatistico, que foi feito pelo método da análise da variância. A porcentagem de eficácia dos inseticidas foi calculada em relação às testemunhas, isto é, parcelas com espigas sem nenhum tratamento.

Os trabalhos foram divididos em três partes: na primeira procurou-se estudar a ação dos inseticidas e ovicidas sôbre as lagartas,

(1) C. I. Bliss — 1937 — Plant Protection, 12. Leningrado.

quando dissolvidos em água. A segunda parte compreendeu o estudo da ação dêsses produtos quando adicionados de 5 a 10% de Citról. A última etapa constou de um estudo comparativo da ação entre pós molháveis e concentrados emulsionáveis de alguns dos inseticidas.

RESULTADOS

Para facilidade de interpretação dos dados serão abordados apenas os correspondentes às espigas atacadas. A numeração das tabelas é a mesma dos campos experimentais.

Campo 1 — Onze inseticidas foram usados. Todos, com exclusão do metoxiclór, Lindane e BHC, apresentaram resultados que diferiram significantemente dos das espigas testemunhas, isto é, não tratadas. Sòmente DDT, Endrin, Isodrin e Clordane apresentaram diferenças altamente significativas em relação a elas.

TABELA 2

Infestação de *Heliothis obsoleta* em um campo onde foram aplicadas pulverizações de ovicidas sem óleo emulsionável. Campinas, 1954.

TRATAMENTOS	Espigas Atacadas		Espigas com lagartas vivas	
	Porcentagem	Porcentagem de eficácia	Porcentagem	Porcentagem de eficácia
0,05% Metacide	67,5	15,6	47,5	20,8
0,05% EPN 300	67,5	15,6	62,5	0,0
0,05% DN-111	72,5	9,4	57,5	4,2
0,15% Sulfenona	75,0	6,2	55,0	8,3
0,05% Dinitro-o-fenol	80,0	0,0	67,5	0,0
0,15% Ovotran	82,5	0,0	67,5	0,0
0,05% Aramite	85,0	0,0	62,5	0,0
0,15% Sulfato Nicotina	85,0	0,0	67,5	0,0
Testemunha	80,0		60,0	

Campo 2 — Neste campo oito ovicidas foram experimentados, tendo sido feitas cinco pulverizações deles. Nenhum dos produtos testados apresentou resultados que diferissem estatisticamente dos das espigas testemunhas, sem tratamento.

TABELA 3

Infestação de *Heliothis obsoleta* em um campo onde foram aplicadas pulverizações de inseticidas acompanhadas de 10% de Citról. Campinas, 1953.

TRATAMENTOS	Espigas Atacadas			Espigas com lagartas vivas		
	Porcentagem	Média Angular	Porcentagem de eficácia	Porcentagem	Média Angular	Porcentagem de eficácia
0,75% DDT	3,7	10,5	96,2	3,7	9,7	94,2
0,10% Endrin	7,5	15,9	92,4	7,5	15,6	88,2
0,10% Dieldrin	17,5	25,8	82,3	13,7	20,7	78,5
0,10% Lindane	18,7	25,1	81,0	11,2	16,5	82,4
0,75% Toxafeno	20,0	23,4	79,7	12,5	19,7	80,4
0,10% Aldrin	21,2	24,2	78,5	12,5	19,9	80,4
0,10% Parathion	23,7	27,7	76,0	20,0	26,2	68,6
0,75% Clordane	31,2	33,7	68,4	26,2	30,2	58,9
Testemunha	98,7	89,2		63,7	53,3	
Dif. Min. Signif. Nivel 5%		10,4			14,3	
Dif. Min. Signif. Nivel 1%		14,3			19,3	

Campo 3 — Oito inseticidas tomaram parte nêste experimento, recebendo todas as espigas, menos as testemunhas, 10% de Citról. Todos os resultados das parcelas tratadas diferiram de modo altamente significativo das parcelas sem tratamento. O melhor dos tratamentos, DDT, apresentou diferença altamente significativa em relação a todos os demais, com exclusão do Endrin. O Endrin diferiu de modo altamente significativo apenas do Clordane e significantemente do Parathion.

TABELA 4

Infestação de *Heliothis obsoleta* em um campo onde foram aplicadas pulverizações de inseticidas acompanhadas de 10% de Citról. Campinas, 1953.

TRATAMENTOS	Espigas Atacadas			Espigas com lagartas vivas		
	Porcentagem	Média Angular	Porcentagem de eficácia	Porcentagem	Média Angular	Porcentagem de eficácia
0,75% DDT	3,7	9,7	95,7	3,7	9,7	94,9
0,75% Toxafeno	6,2	14,3	92,8	2,5	6,4	96,5
0,10% Endrin	7,5	15,6	91,3	5,0	11,0	93,1
0,10% Isodrin	10,0	15,8	88,4	3,7	7,8	94,9
0,10% Aldrin	10,0	18,1	88,4	5,0	11,0	93,1
0,10% Parathion	10,0	17,8	88,4	6,2	12,1	91,4
0,10% Dieldrin	12,5	20,6	85,5	10,0	18,1	86,2
0,10% Lindane	17,5	23,0	79,7	12,5	17,2	82,7
Testemunha	86,2	68,7		72,5	58,5	
Dif. Min. Signif. Nivel 5%		8,9			10,3	
Dif. Min. Signif. Nivel 1%		12,1			14,0	

Campo 4 — Neste campo todos os inseticidas receberam 5% de Citról. Foram testados os mesmos inseticidas do campo 3, sendo substituido apenas o Clordane pelo Lindane. Todas as parcelas sob tratamento diferiram de modo altamente significativo das parcelas testemunhas. O melhor tratamento, DDT, apresentou diferença significativa em relação ao Lindane e apenas significativa em relação ao Dieldrin. DDT, Toxafeno, Endrin, Isodrin, Aldrin e Parathion não diferiram estatisticamente entre sí.

TABELA 5

Infestação de *Heliothis obsoleta* em um campo onde foram aplicadas pulverizações de inseticidas acompanhados de 5% de Citról. Campinas, 1954.

TRATAMENTOS	Espigas Atacadas			Espigas com lagartas vivas		
	Porcentagem	Média Angular	Porcentagem de eficácia	Porcentagem	Média Angular	Porcentagem de eficácia
0,60% DDT	1,2	3,2	98,2	0,0	0,0	100,0
0,08% Endrin	8,7	14,6	86,8	7,5	11,4	38,0
0,08% Dieldrin	15,0	22,0	77,3	13,7	21,0	78,1
0,08% Aldrin	16,2	22,8	75,5	16,2	22,8	74,1
0,60% Metoxiclór	20,0	26,0	69,8	20,0	26,0	68,0
0,08% Isodrin	21,2	27,3	68,0	17,5	24,4	72,0
0,08% Parathion	23,7	28,3	64,2	20,0	24,5	68,0
0,60% Toxafeno	26,2	30,6	60,4	18,7	22,4	70,1
Testemunha	66,2	54,6		62,5	52,4	
Dif. Min. Signif. Nivel 5%		10,4			15,2	
Dif. Min. Signif. Nivel 1%		14,1			20,6	

Campo 5 — Foram empregados os mesmos inseticidas do campo 4, com exceção do Lindane, que foi substituido pelo Metoxiclór; todos porem em porcentagens mais baixas. Os oito produtos mostraram diferir de modo altamente significativo da testemunha sem tratamento, no que se refere a espigas atacadas. O melhor tratamento, DDT, diferiu de maneira altamente significativa dos demais, com exceção do Endrin. O Endrin apresentou diferença altamente significativa em relação ao Toxafeno e significativa quanto ao Metoxiclór, Isodrin e Parathion. Não houve diferença estatística entre Endrin, Dieldrin e Aldrin, nem entre os demais, com exclusão de DDT e Endrin.

TABELA 6

Infestação de *Heliothis obsoleta* em um campo onde foram aplicadas pulverizações de ovicidas acompanhados de 5% de Citról. Campinas, 1954.

TRATAMENTOS	Espigas Atacadas		Espigas com lagartas vivas	
	Porcentagem	Porcentagem de eficácia	Porcentagem	Porcentagem de eficácia
0,15% Sulfato Nicotina	52,5	32,2	47,5	20,8
0,05% EPN-300	57,5	25,8	50,0	16,7
0,05% Metacide	60,0	22,6	40,0	33,3
0,15% Sulfenona	65,0	16,1	45,0	25,0
0,05% 2,4 Dinitro-o-fenol	67,5	12,9	50,0	16,7
0,05% DN-111	70,0	9,7	52,5	12,5
0,05% Aramite	70,0	9,7	55,0	8,3
0,15% Ovotran	72,5	6,4	67,5	0,0
Testemunha	77,5		60,0	

Campo 6 — Neste campo foram testados os mesmos oito ovicidas experimentados no campo 2, porem recebendo cada um 5% de Citról. Se bem que tivesse havido um aumento na porcentagem de eficácia, nenhum tratamento apresentou diferença estatística em relação à testemunha, ou sejam, espigas sem inseticida.

TABELA 7

Infestação de *Heliothis obsoleta* em um campo onde foram aplicados inseticidas sob a forma de pós molháveis e concentrados emulsionáveis, acompanhados de 5% de Citról. Campinas, 1954.

TRATAMENTOS	Espigas Atacadas			Espigas com lagartas vivas		
	Porcentagem	Média Angular	Porcentagem de eficácia	Porcentagem	Média Angular	Porcentagem de eficácia
0,40% DDT (P.M.) (1)	5,0	8,9	94,7	2,5	6,4	97,0
0,40% DDT (C. E.) (2)	6,2	14,3	93,4	5,0	11,0	94,0
0,06% Endrin (C.E.) .	13,7	21,3	85,4	12,5	19,9	85,1
0,06% Dieldrin (P.M.)	20,0	26,5	78,6	17,5	24,4	79,1
0,06% Dieldrin (C.E.)	23,7	28,4	74,7	21,2	27,7	74,7
0,06% Aldrin (P.M.) .	27,5	27,9	70,6	22,5	24,9	73,1
0,06% Aldrin (C.E.) ..	31,2	32,6	66,7	28,7	31,0	65,7
5% Citról	26,2	29,6	72,0	22,5	26,7	73,1
Testemunha	93,7	77,8		83,7	66,4	
Dif. Min. Signif. Nivel 5%		16,6			15,2	
Dif. Min. Signif. Nivel 1%		22,5			20,6	

(1) Pó molhável.
(2) Concentrado emulsionável.

Campo 7 — Foram comprados pós molháveis e concentrados emulsionáveis de DDT, Dieldrin e Aldrin e concentrado emulsionável de Endrin, havendo um tratamento de Citról apenas. Todas as espigas sob tratamento, inclusive as que receberam Citról, diferiram de maneira altamente significativa das espigas não tratadas. Sómente as que receberam o pó molhável de DDT diferiram significantemente das com Citról. Não houve diferença estatistica entre a ação dos pós molháveis e concentrados emulsionáveis respectivamente de DDT, Dieldrin e Aldrin. Dos concentrados emulsionáveis sómente houve diferença significativa entre os resultados do DDT e Aldrin. O pó molhável de DDT apresentou números que diferiram significativamente em relação aos pós molháveis de Dieldrin e Aldrin.

TABELA 8

Infestação de *Heliothis obsoleta* em um campo onde foram aplicados inseticidas sob a forma de pós molháveis e concentrados emulsionáveis acompanhados de 5% de Citról. Campinas, 1954.

TRATAMENTOS	Espigas Atacadas			Espigas com lagartas vivas		
	Porcentagem	Média Angular	Porcentagem de eficácia	Porcentagem	Média Angular	Porcentagem de eficácia
0,30% DDT (C.E.) ...	15,0	21,5	82,1	13,7	20,7	81,7
0,30% DDT (P.M.) ...	22,5	27,6	73,1	20,0	25,2	73,3
0,05% Endrin (C.E.) .	15,0	22,6	82,1	13,7	21,3	81,7
0,05% Dieldrin (P.M.)	25,0	29,7	70,1	22,5	27,8	70,0
0,05% Dieldrin (C.E.)	33,7	35,4	59,7	28,7	32,2	61,7
0,05% Aldrin (P.M.) .	30,0	32,9	64,1	28,7	32,2	61,7
0,05% Aldrin (C.E.) .	40,0	38,7	52,2	35,0	34,8	53,3
5% Citról	20,0	25,5	76,1	15,0	21,8	80,0
Testemunha	83,7	66,4		75,0	60,5	
Dif. Min. Signif. Nivel 5%		10,9			12,0	
Nivel 1%		14,7			16,2	

Campo 8 — Nesse campo fez-se uma repetição do processo relativo ao campo 7, com diferença de porcentagem de principio ativo dos produtos, que foi menor. Novamente houve diferenças altamente significativas entre os resultados de todos os tratamentos, inclusive o Citról, e os da testemunha, sem tratamento. Os pós molháveis de DDT, Dieldrin e Aldrin não apresentaram diferença estatistica dos respectivos concentrados emulsionáveis, no que se refere a espigas atacadas. Houve diferença ao nivel de 5% entre as parcelas tratadas com concentrado emulsionável de DDT e as com Dieldrin, e ao nivel de 1% entre as do DDT e do Aldrin. Os pós molháveis de DDT, Aldrin e Dieldrin não diferiram estatisticamente entre sí, com referência às espigas atacadas. Os resultados de Citról sómente diferiram significantemente dos do concentrado emulsionável de Aldrin.

DISCUSSÃO

Ação dos inseticidas e ovicidas sem óleo

Pode-se verificar, na tabela 1, que dos onze inseticidas testados sòmente quatro, DDT, Endrin, Isodrin e Clordane, apresentaram resultados que diferiram de modo altamente significativo dos da testemunha, isto é, espigas sem tratamento. No entanto, baixas foram as porcentagens de eficácia, atingindo o melhor tratamento, DDT, apenas 81,8%. Dos oito ovicidas experimentados no campo 2, nenhum teve eficácia acima de 21%, o que representa, para as concentrações usadas, resultado ínfimo.

Ação dos inseticidas e ovicidas com óleo mineral.

No campo 3, oito inseticidas foram aplicados juntamente com 10% de Citról. Os inseticidas que mostraram eficácia acima de 90% foram 0,75% DDT e 0,10% Endrin, havendo diferenças estatísticas entre a ação do DDT e dos demais, com exceção de Endrin. No campo 4 os mesmos tóxicos, menos o Clordane, que foi substituido pelo Lindane, receberam apenas 5% de Citról. Nòvamente 0,75% DDT e 0,10% Endrin, acompanhados por 0,75% Toxafeno, foram os únicos inseticidas cuja eficácia atingiu a mais de 90%. Não houve estatiscamente diferenças entre êsses três inseticidas clorados.

A concentração dos inseticidas foi diminuida no campo 5, sendo porem mantida a do Citról. Apenas 0,60% DDT apresentou eficácia satisfatoria, tendo 0,08% Endrin dado 86,8%. Estatisticamente, houve diferença significativa entre a ação do DDT e Endrin.

Os mesmos ovicidas testados no campo 2 foram nòvamente experimentados no campo 6, desta vez porem com 5% de Citról. Os resultados não foram animadores, porquanto o melhor dos inseticidas, 0,15% Sulfato de Nicotina, deu apenas 32,2% de eficácia.

Comparação entre a ação dos pós molháveis e concentrados emulsionáveis.

Foram comparados no campo 7, pós molháveis e concentrados emulsionáveis de DDT, Dieldrin e Aldrin, concentrado emulsionável de Endrin e Citról, recebendo também todos os inseticidas 5% de Citról. De todos os produtos testados, apenas 0,40% DDT, tanto na forma de pó molhável como na de concentrado emulsionável, tève eficácia acima de 90%, não tendo havido diferença estatistica entre ambos.

Um novo experimento semelhante ao anterior foi levado a efeito no campo 8, sendo porem menores as porcentagens de principio ativo empregadas. Nenhum dos inseticidas, inclusive 0,30% DDT, proporcionou apreciável combate à praga.

CONCLUSÕES

Levando-se em consideração o que foi explanado neste trabalho, podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1) Dos 10 inseticidas testados com Citról, apenas três, 0,40% DDT, 0,10% Endrin e 0,75% Toxafeno, quando adicionados de 5% de óleo mineral, tiveram eficacia acima de 90%. Quando aplicados sem Citról, apenas dissolvidos em água, nenhum dos 11 tóxicos experimentados atingiu a essa porcentagem.

2) Não se registrou eficácia apreciável em nenhum dos 8 ovicidas estudados, quer aplicados com ou sem Citról.

3) Quando aplicado sozinho, dissolvido em água, 5% de Citról apresentou 76,1% e 72% de eficácia em espigas atacadas.

4) Não houve diferenças estatísticas entre a ação de pós molháveis de DDT, Dieldrin e Aldrin e os respectivos concentrados emulsionáveis, quando adicionados a ambos os tipos de formulações, 5% de Citról.

CONTROL OF THE "CORN EARWORM" *HELIOTHIS OBSOLETA* (FABR., 1793) IN SWEET CORN EARS WITH SOME ORGANIC INSECTICIDES.

Abstract

I na trial to control the "Corn Eearworm" experiments with 11 insecticides and 8 ovicides have been carried on at the "Secção de Entomologia Agricola" of "Instituto Biologico", in Campinas, State of São Paulo, Brazil.

All products were used as spray on the base of 600 liters per hectare.

Four applications of the insecticides and five of the ovicides were made at 3 day intervals, the first of them when 10 per cent of the stalks were showing silk.

Fifteen days after the last spray 20 ears were harvested at random per plot. Counts of damaged ears as well as those with still living worms were performed.

The results of these experiments showed that 0.40 per cent DDT, 0.10 per cent Endrin and 0.75 per cent Toxaphene plus 5 per cent white mineral oil emulsion gave more than 90 per cent control.

None of the ovicides tested as spray gave satisfactory results.

The results of sprays with DDT, Dieldrin and Aldrin wettable powders and their respective emulsifiable concentrates with 5 per cent white minearl oil did not likewise give significant differences.

———o———

Vol. 22 — Artigo 3 Maio de 1955

DUAS ESPÉCIES NOVAS DO GÊNERO *ANASTREPHA* (DIPT., TRYPETIDAE)*

POR

Vireshwar Nath Capoor

Universidade de Allahabad, Índia.

Com as estampas, 1, 2 e 3

Em seu trabalho "Uma nova espécie do gênero *Anastrepha*", o autor, ao descrever a nova espécie: *Anastrepha Costa-Rukmanii* CAPOOR, fez menção também de duas significativas máculas na base do "rasper", vistas em alguns dos exemplares da espécie *Anastrepha fraterculus* WIED, 1830, existentes na coleção do Prof. Dr. A. DA COSTA LIMA, e que se acha no Instituto Oswaldo Cruz. Maior número de exames de tôdas as espécies deste gênero levou-o a descobrir que essas máculas significativas só se encontravam em *A. fraterculus* WIED, 1830, com exceção da variedade *A. fraterculus soluta* BEZZI.

Esta variedade, contudo, foi considerada por COSTA LIMA e ALAN STONE como uma pseudo-variedade, como frisou COSTA LIMA em carta que escreveu a ALAN STONE e em trabalho que êste escreveu sôbre as moscas de frutas: "The fruitflies of the genus *Anastrepha*", U. S. Dept. of Agriculture Misc. Publ. No. 439, à página 80.

Na carta do Professor COSTA LIMA, acima referida, lê-se:

"Estou ainda mais convencido de que *soluta* é uma simples variação de *fraterculus*. Examinei formas que podem ser consideradas como daquela pseudo-variedade, situando-se entre os tipos comuns de *fraterculus* com a bainha do ovipositor clara ou escura".

O autor é da mesma opinião e considera também que não há razão para a criação da variedade *soluta* e que ela deve ser considerada ùnicamente como um representante da espécie *A. fraterculus*.

Mas é curioso notar que essas máculas não puderam ser notadas, não só em tôdas as formas de *A. fraterculus*, WIED, mas também em tôdas as de *A. fraterculus soluta* BEZZI. Após exames mais acurados pôde o autor ainda notar que a presença ou ausência dessas máculas dependia da quitinização ou rijeza da bainha do ovipositor.

Embora ALAN STONE, em seu próprio trabalho acima referido, tenha aceitado o ponto de vista de COSTA LIMA, escreve à página 80:

---

* Trabalho realizado sob orientação do prof. A. da Costa Lima, na Escola Nacional de Agronomia, Distrito Federal. O autor agradece, além de ao prof. Costa Lima, ao prof. José de Aguiar Guimarães pelas constantes sugestões e pela tradução do original para o português, e ao sr. Carlos Lacerda pelas fotografias.

"COSTA LIMA notou diferença na côr de bainha do ovipositor, ao estudar o material do Brasil, mas está convencido de que isso não representa uma diferença específica".

Contudo o autor não está plenamente de acôrdo com êsse ponto de vista; é de opinião de que a diferença na côr ou quitinização da bainha do ovipositor tem relação definida com a presença das duas máculas, exceção feita quanto ao exemplar coletado, em Itatiaia — 700 m, de altitude, por W. ZIKAN em 16-3-34, descrito linhas adiante como uma espécie nova.

As máculas em questão ocorrem uma de cada lado na região postero-ventro-lateral do "rasper".

A côr das máculas ** é parda (c. f. *A. Costa-Rukmanii* Capoor em que as máculas são pretas). Estas máculas são pequenas e de forma mais ou menos linear.

Desde que exista considerável variação na forma das faixas alares, nada se pode dizer definitivamente. Mas o autor, separando e examinando todos os exemplares de *fraterculus* quanto aos carateres acima mencionados acredita que provàvelmente tôdos os espécimens sem essas máculas e sem a bainha do ovipositor quitinizada têm a faixa em *S* reunida à faixa costal da nervura R4+5 e a faixa em *V* separada da faixa em *S*, fig. 2, enquanto em tôdos os exemplares em que as máculas se acham presentes e o ovipositor quitinizado, notam-se variadas formas de faixa nas asas.

Dêsse modo, embora aceitando esta opinião de que a última condição representa a verdadeira *A. fraterculus* WIED, 1830, o autor expressa sua inabilidade, em virtude de não poder permanecer no Brasil, para comparar estas espécies com o tipo de *A. fraterculus* (descrita por WIEDMANN no ano de 1830). Mas estribado nos fatos acima e acreditando que *A. fraterculus* WIED. tenha larga distribuição e variados aspectos de asas, sente que as espécies que reunem esses caracteres representam o tipo *A. fraterculus* WIED. 1830.

Nova descrição de *A. fraterculus* WIED, 1830 pelo autor

Tamanho pequeno; pardo-amarelada. Mesonotum pardo-amarelado e com o comprimento de 2,75-3,3 mm; lista mediana do mesonoto alargada posteriormente e anterior às cerdas acrósticas e não incluindo estas cerdas; listas laterais da sutura transversas ao escutelo; humerus

** O autor teve, algumas vezes, dificuldade em divisar estas máculas em alguns exemplares com "ovipositor" mais quitinizado, já que elas ficavam escondidas pelos ganchos do "rasper". Mas obteve êxito clarificando-os em preparações microscópicas, fazendo pressão sôbre a laminula, na região do "rasper", com uma agulha ou pinça.

e escutelo pardo-claros; pleura amarela e pardo-amarelada; metanotum e postescutelo bastante enegrecidos lateralmente. *Macrochaetae* variando de pardo-amarelado a negro, pêlos amarelo-pardos. Cerdas esternopleurais finas. Asas com comprimento 5,35-7,7 mm.. Faixas amarelo-alaranjadas e pardo-claras. Faixa costal tocando tipicamente a faixa em *S* e a faixa em *V* tipicamente separada da faixa em *S*; mas a forma da asa com considerável variação conforme as observações atrás mencionadas (figs. 1, 2 da estampa 1 e Quadro 1).

Terminalia da fêmea: comprimento da bainha do ovipositor 1,65-2,6 mm, robusto, muito quitinizado e mais pardo, afinando apicalmente; espiráculos a cêrca de 0,7-0,94 mm., da base, "rasper"; no mais com ganchos robustos dispostos em 4-6 fileiros. Presentes na porção póstero-ventro-lateral do "rasper" duas pequenas máculas lineares pardas, uma de cada lado (figs. 4 e 4a da estampa 2). Comprimento do ovipositor 1,5-1,95 mm.; a porção, compreendida entre o oviducto e a extremidade serrilhada apresenta-se estreitada; o serrilhamento, não aguçado mas arredondado, alcançando um pouco mais da metade da ponta, às vezes menos.

Terminalia do macho: Razão tergal cêrca de 0,87; comprimento do claspers 0,35 mm., moderadamente robusto na base, muito achatado no ápice; êste algo estreitado, com um ápice arredondado; dentes ligeiramente na metade basal.

O autor apresenta um quadro, mostrando várias medidas de diferentes partes da genitália e asas por ele examinadas, num certo número de espécies, tendo as duas máculas na base do "rasper" e a bainha do ovipositor quitinizada:

Quadro n.º 1

N.º da preparação microscópica, na coleção do Inst. Oswaldo Cruz	Comprimento do ovipositor	Espessura do ovipositor	Comprimento da bainha do ovipositor	Comprimento da ponta do ovipositor	Distância dos espiráculos da base	N.º da fileira do gancho no "rasper"
2610	1,75 mm	0,115 mm	2,60 mm	0,27 mm	0,74 mm	5
1969	1,61 mm	0,12 mm	1,72 mm	0,21 mm	0,75 mm	6
2611	1,71 mm	0,12 mm	2,20 mm	0,25 mm	0,80 mm	6
3401	1,61 mm	0,12 mm	2,02 mm	0,25 mm	0,82 mm	6
3923	1,63 mm	0,115 mm	1,86 mm	0,24 mm	0,75 mm	5
2905	1,71 mm	0,13 mm	2,50 mm	0,25 mm	0,89 mm	5

(Continuação)

N.º da preparação microscópica, na coleção do Inst. Oswaldo Cruz	Comprimento do ovipositor	Espessura do ovipositor	Comprimento da bainha do ovipositor	Comprimento da ponta do ovipositor	Distância dos espiráculos da base	N.º da fileira do gancho — s no "rasper"
3971	1,58 mm	0,12 mm	1,85 mm	0,23 mm	0,84 mm	6
2142	1,60 mm	0,125 mm	2,00 mm	0,22 mm	0,84 mm	5
2143	1,65 mm	0,12 mm	2,10 mm	0,24 mm	0,83 mm	4
2140	1,65 mm	0,12 mm	2,00 mm	0,22 mm	0,78 mm	5
2141	1,70 mm	0,12 mm	2,20 mm	0,23 mm	0,94 mm	5
3911	1,45 mm	0,12 mm	1,58 mm	0,18 mm	0,74 mm	6
3915	1,51 mm	0,12 mm	1,68 mm	0,18 mm	0,72 mm	5
3927	1,51 mm	0,12 mm	1,72 mm	0,22 mm	0,69 mm	6

No segundo quadro, que se segue, pode ver-se o comprimento das asas correspondentes ao número de lâminas do quadro 1 bem como o tipo da forma das asas.

Quadro n.º 2

N.º das lâminas	N.º das lâminas correspondentes ao quadro N.º 1	Comprimento das asas	Tipo ou condição das asas e suas faixas (**)
3412	2610	7,50 mm	A
3391	1969	6,50 mm	A
3400	2611	6,00 mm	B
3402	3401	6,10 mm	A
3922	3923	6,50 mm	B
3970	3971	7,20 mm	C
3910	3911	5,50 mm	C
3926	3927	5,20 mm	D
3912 (macho)		5,30 mm	C
3968 (macho)		5,80 mm	B

(**) As letras denotam as seguintes condições da forma da asa:
A — Faixa em S junto a faixa costal em R4+5, faixa em V, separada da em S.

B — Todas as faixas separadas

C — Faixa em *S* ligeiramente junto à faixa costal em R4+5 e faixa em *V* também tocando a faixa em *S* em R4+5

D — Faixa em *S*, separada, faixa costal e faixa em *V*, tocando a faixa em *S* em R4+5.

Plantas hospedeiras: Abacate (Persea americana), ameixa do Pará, ameixa japonesa (Eriobotrya japonica), Anona humboldtiana, Anona cherimola, araçá (Psidium araçá), cabeluda, bagas de café (Coffea arabica), Citrus spp. (C. aurantium), C. decumana, C. japonica, C. nobilis (tangerina), figos (Ficus carica), goiabas (Psidium guajava, P. cattleyanum, P. lucidum), jaboticaba (Myrcia jaboticaba), Kaki (Diospyros Kaki), maçã (Pyrus malus), morangos (Fragaria vesca), pecego (Prunus persica), pera (Pyrus communis), Phylocalyx sp., pitangas, Prunus armeniaca, cajás (Spondias dulcis, S. mombin, S. purpurea).

2. *Anastrepha scholae* n. sp.,

Descrição:

Porte pequeno ou muito pequeno, amarelo-pardo, Mesonotum amerelo pardo com 2,65-3,2 mm., de comprimento; humerus e scutellum amarelo-claros; estria mediana posteriormente alargada e em frente às cerdas acrosticas, rodeando excepcionalmente estas cerdas; estrias laterais partindo da sutura transversa do protorax e indo até o scutellum; pleura amarela e amarelo-parda; metanotum e postscutellum mais escuros lateralmente. Macrochaetae variando do amarelo-pardo ao negro; pelo amarelo-pardo. Cerdas esternopleurais finas. Asas 5,5-7,5 mm., de comprimento, faixas amarelo-alaranjadas. Faixa costal tipicamente tocando a faixa em *S* e a faixa em *V* tipicamente separada da em *S*, fig. 2 da estampa 1.

Bainha do ovipositor afinando àpicalmente e com 1,65-2,35 mm., de comprimento, nem forte, nem quitinixada ou de côr muito escura. Espiráculos situados a cêrca de 0,76-0,86 mm., da base. Rasper algo pequeno, com 4-6 fileiras de ganchos não robustos. Ausência de manchas lineares pardas na porção póstero-latero-ventral do "rasper" fig. 5. da estampa 3. Ovipositor com 1,50-1,95 mm., de comprimento, com a ponta estreitada além do fim do oviducto e antes da porção serrilhada; serrilhamento não aguaçado e aredondado, alcançando um pouco mais da metade do comprimento da ponta, às vezes menos.

Terminalia do macho: Razão tergal 0,87; clasper com cêrca de 0,35 mm. de comprimento moderamento engrossado na base, poção apical algo curva com a ponta um tanto romba, dentes ligeiramento no meio.

O nome da espécie é dedicado ao nome da Instituição em que o autor trabalhou durante a sua estada no Brasil.

O quadro que se segue dá uma idéia comparativa do comprimento das diferentes partes da genitália da fêmea, nas espécies em que as máculas não estão presentes e a bainha do ovipositor não é quitinizada.

Quadro n.º 3

N.º das lâminas	Comprimento do ovipositor	Espessura do ovipositor	Comprimento da bainha do ovipositor	Comprimento da ponta do ovipositor	Distância dos espiráculos	N.º de fileiros de ganchos	Comprimento das asas	Tipo ou condição das faixas das asas
3479	1,75 mm	0,15 mm	2,01 mm	0,24 mm	0,77 mm	6	5,7 mm	A
3480	1,72 mm	0,13 mm	2,05 mm	0,21 mm	0,78 mm	6	5,5 mm	A
3468	1,60 mm	0,14 mm	2,15 mm	0,24 mm	0,76 mm	5	6,0 mm	A
3464	1,72 mm	0,14 mm	2,02 mm	0,25 mm	0,81 mm	5	6,5 mm	A
3460	1,54 mm	0,13 mm	2,35 mm	0,22 mm	0,82 mm	4	5,9 mm	A
2603	1,52 mm	0,12 mm	2,30 mm	0,20 mm	0,78 mm	5	5,7 mm	A
3267	1,71 mm	0,15 mm	2,10 mm	0,24 mm	0,86 mm	5	6,0 mm	A
3931	1,72 mm	0,14 mm	2,04 mm	0,24 mm	0,82 mm	4	7,2 mm	A
3764	1,53 mm	0,12 mm	1,85 mm	0,22 mm	0,76 mm	5	5,6 mm	A

(*) Faixa em S junto com a faixa costal em R4+5, em V, separada da em S.

Plantas hospedeiras: As mesmas mencionadas para *A. fraterculus* WIED.

Dêste modo uma comparação dos Quadros 1 e 2 com o de n.º 3 revelerá que aparentemente não há diferença entre *A. fraterculus* e *A. scholae* n. sp., excepto no fato de que nesta as máculas significativas se acham ausentes e em que a bainha do ovipositor não é quitinizada.

3. *Anastrepha pseudo-fraterculus* n. sp.

Descrição:

Porte pequeno, amarelo-pardo. Metanotum com 3,0 mm. de comprimento; estria mediana alargando-se ligeiramente para a parte posterior e diante das cerdas acróstices e rodeando-as; estrias laterais da sutura transversa ao scutellum, êste de côr amarelo-pardo claro, pleura amarelo-pardo; metanoto algo enegrecido lateralmente. Macrochaetae pardo-escuras; pêlo amarelo-pardo. Cerdas esternopleurias finas. Asa com 6,0 mm. de comprimento; faixas pardas; faixa em *S* na nervura R4+5.

Terminália da fêmea: Comprimento da bainha do ovipositor 1,96 mm., afinando apicalmente, de coloração não muito escura; espiráculos situados a cêrca de 0,7 mm. da base do "rasper", de tamanho médio, com 6 fileiras de granchos fortes, duas pequenas máculas lineares de côr parda presentes de cada lado na porção póstero-latero-ventral do "rasper".

Comprimento da bainha do ovipositor 1,73 mm.; ponta estreitada além do fim do oviducto e antes da porção serrilhada; serrilhamento da ponta da ovipositor não aguçado e arredondado, estendendo-se um pouco além da metade do comprimento da ponta do ovipositor.

Terminália do macho: Região tergal 0,79, comprimento do clasper cêrca de 0,35 mm., moderadamente engrossado na base, achatado apicalmente, porção apical algo estreitada, com um ápice não aguçado e ligeiramente curvo; dentes na porção médio-basal.

Holotipo: — 1 macho e 1 fêmea, apanhados por WALTER ZIKAN em Itatiaia, E. do Rio a 16-3-34 e guardado na coleção de entomologia do Instituto Oswaldo Cruz, sob o n.º 5772 e 5773 respectivamente. As asas do exemplar 5773 (fêmea) na lâmina n.º 4504 e abdómen na lâmina 4505; e asas do exemplar n.º 5772 (macho) na lâmina 4502 e abdómen na lâmina n.º 4503.

TWO NEW SPECIES OF THE GENUS *ANASTREPHA*

Abstract

Confusion in the determination of the species of A. fraterculus WIED *has necessitated the differentiation of this species. The differentiation has mainly been based on the presence and absence of two brownish linear spots at the postero-latero-ventral aspects of the rasper, which so far have not been recognised by previous writers, and also on the chitinisation or deep brown color of the ovipositor sheath. Thus examples which possess these characters have now been termed as A. fraterculus* WIED; *others which do not possess have been named as A. scholae n. sp., while examples which only bear these significant spots at the base of the rasper have been termed as A. pseudo-fraterculus n. sp.*

BIBLIOGRAFIA

BEZZI, M., — 1909 — Le specie dei generi *Ceratitis, Anastrephas* e Dacus Boll. Lab. Zool. Gen. Agrar. R. Scuola Sup. Agric. Portici 3: 273-313,4. fig.

COSTA LIMA, A. DA., — 1934 — Moscas de frutas do genero *Anastrepha* Schiner, 1868 (Dipt: Trypetidae). Instituto Oswaldo Cruz. Mem. 28: 487-575 illus.

GREENE, CHARLES T. — 1934 — A revision of the genus *Anastrepha* based on a study of the wings and on the length of the ovipositor sheath. (Dipt: Trypetidae). Wash. Ent. Soc. Proc. 36: 127-179, illus.

LOEW, H. — 1873 — Review of the North American Trypetna. In monographs of the Diptera of North America, pt. 3. Smithsn. Inst. Misc. Collect. 11 (256): 211-351.

STONE, ALAN. — 1942 — The fruitflies of the genus Anastrepha. U. S. Dept. of Agric., Misc. Publ. n.º 439.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS 1, 2 e 3

ESTAMPA — 1 —

Fig. 1. Asa de *Anastrepha fraterculus* Wied.
lâmina N.º 3922
Fig. 2. Asa de Anastrepha scholae n. sp.
lâmina N.º 3761
Fig. 3. Asa de *Anastrepha pseudo-fraterculus.*
lâmina N.º 4504

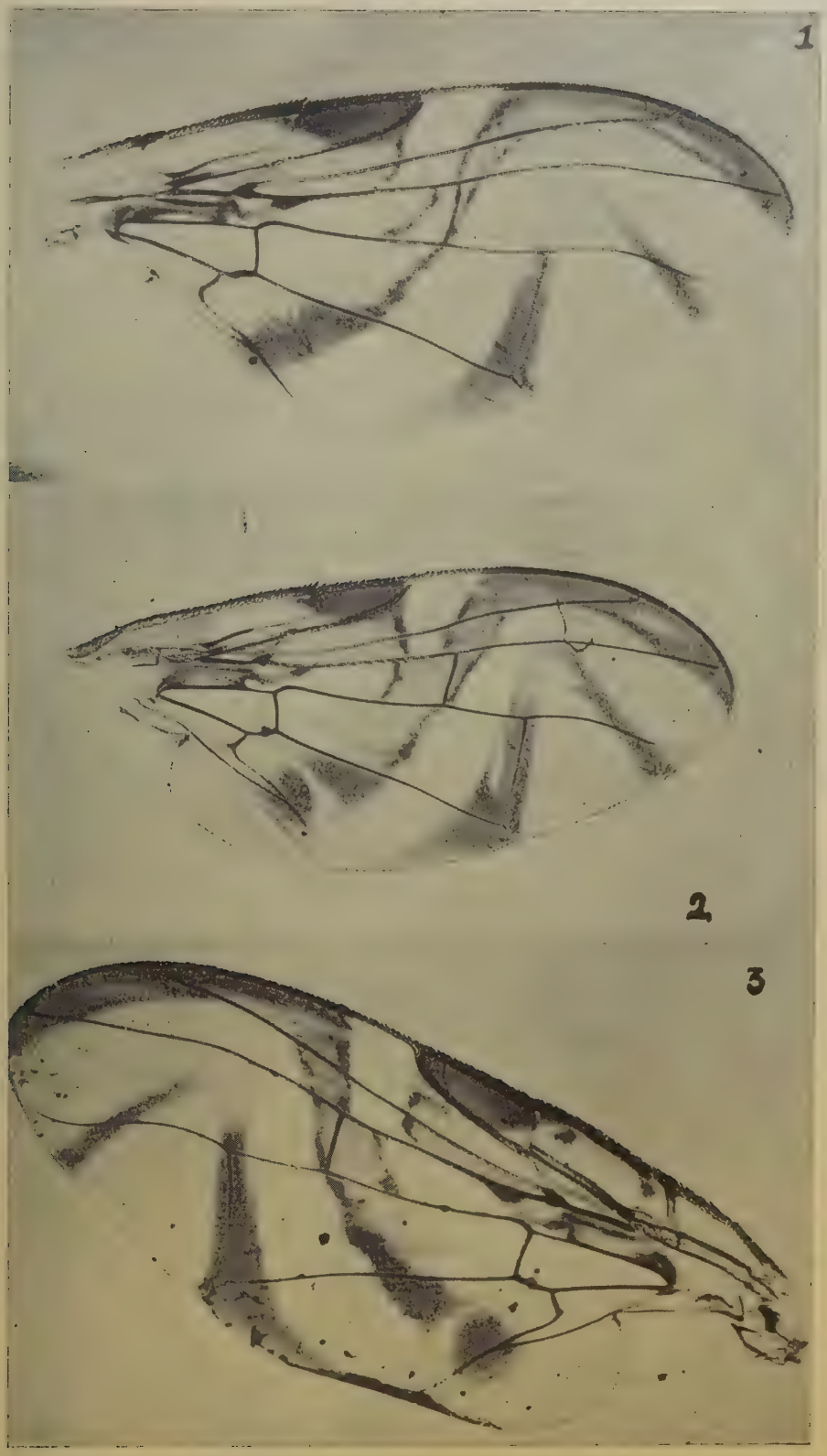
ESTAMPA — 2 —

Fig. 4. Abdome de *A. fraterculus Wied.*
lâmina N.º 3923
Fig. 4.ª Abdome de *A. fraterculus* Wied.

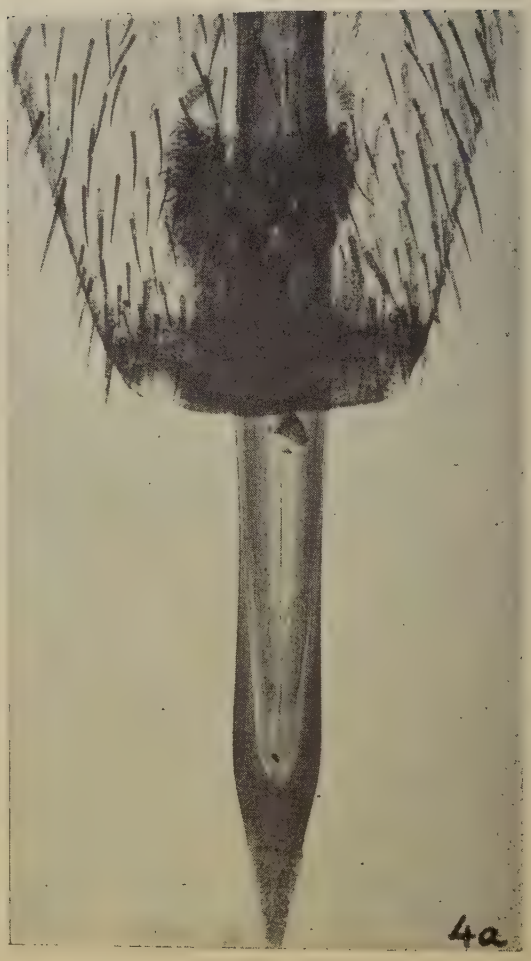
ESTAMPA — 3 —

Fig. 5. Abdome de *A. scholae* n. sp.
lâmina N.º 3764
Fig. 6. Abdome de *A. pseudo-fraterculus* n. sp.
lâmina N.º 4505
Fig. 7. Abdome de macho da *A. pseudo-fraterculus.*
lâmina N.º 4504

———o———


1
2
3

4


4a

5

6

7

Vol. 22 — Artigo 4 Maio de 1955

DISCUSSÃO E CONFIRMAÇÃO DE ALGUMAS ESPÉCIES DO GÊNERO *ANASTREPHA* (DIPT-TRYPETIDAE)*

POR

Vireshwar Nath Capoor

Allahabad University, Índia.

1. *Anastrepha consobrina* LOEW, 1873

A espécie *A. consobrina* foi descrita pela primeira vez por LOEW no ano de 1873, em Smithsn. Inst. Misc. Collect. 11(256) pp. 230. Um outro exemplar, coletado sôbre Passiflora quadrangularis, E. do Rio, por COSTA, foi posteriormente por êle descrito em 1930. Em 1934, porém, ao receber um único exemplar coletado em Itatiaia, E. do Rio, 700 m. altitude, por J. F. ZIKAN, COSTA LIMA mudou o seu ponto de vista dando a êste último a denominação de *A. consobrina* e denominando o primeiro (*A. consobrina,* COSTA LIMA, 1934) de *A.* ZIKANI n. sp., segundo as razões que apresentou à página 533 do seu trabalho "Moscas de frutas do gênero *Anastrepha*", in Mem. do Inst. Oswaldo Cruz fasc. 4.19-34:

Obtém-se, pois as relações: — 1.ª - 1:1.2; 2.ª - 1:1.5, que são quase idênticas às de *A. consobrina* LOEW. As dimenções de *consobrina,* segundo LOEW, são as seguintes: Corpo — 7,8 a 8,1 mm.; Asa — 9,6 mm.; ovipositor — 6,6 a 6,8 mm.

Neste exemplar único, a curvatura de R4+5 é mais pronunciada que nos exemplares de Estrela.

Daí, acreditar que o exemplar de Itatiaia seja a verdadeira *A. consobrina,* representando, portanto, os espécimens de Estrela, por mim estudados (71) como de *A. consobrina,* os cotipos de uma nova espécie que será aqui referida sob o nome de *A.* ZIKANI".

Novamente ALAN STONE (1942) substituiu *A. consobrina,* COSTA LIMA, 1934 por *A. amnis* n. sp., e reconheceu *A. consobrina,* COSTA LIMA, 1930 (or *A.* ZIKANI, COSTA LIMA, 1934) como a verdadeira *A. consobrina* LOEW, 1873, pelas razões por êle apresentadas em "The fruitflies of the genus *Anastrepha*", U. S. Dept. Agriculture Misc. Publ. N.º 439, às páginas 88 e 89.

"It (i. é. *A. consobrina* of COSTA LIMA, 1934) differs from *A. consobrina* as recognised by the writer, in that vein R2+3 is not

---

* Trabalho realizado na Escola Nacional de Agronomia, Distrito Federal, sob a orientação do prof. A. Costa Lima.

undulent, the ovipositor sheath is more slender and the spiracles are much nearer the base and the tip of the ovipositor is narrower and completely serrate. The ovipositor sheath, originally geiven as 6.3 mm., was corrected to 6.8 mm., by Dr. COSTA LIMA in correspondence".

O autor tomou a seu cargo êste problema.

Para determinação e confirmação o autor recebeu, por bondade do Prof. Dr. COSTA LIMA, mais espécimens, obtidos pelo Dr. FIGUEIREDO, de maracujás (Passiflora quadrangularis), em Maricá no mês de maio de 1954.

Pelo estudo de todos os exemplares e lâminas de *A. Zikani* COSTA LIMA, 1934 e *A. consobrina* de COSTA LIMA, 1934, da coleção do Inst. Oswaldo Cruz e o exame dos espécimens do Dr. FIGUEIREDO, o autor foi levado a concluir, em virtude da sua observação, que pelo menos os espécimens do Dr. FIGUEIREDO e os de *A. Zikani* COSTA LIMA, 1934 são da mesma espécie.

Para qualquer confirmação o autor dá mais abaixo um quadro dos expositivos das medidas de tôdas as partes dos espécimens em questão.

Pelos dados referidos o autor achou que, quer em *A. consobrina* COSTA LIMA, 1934 quer em *A. Zikani* COSTA LIMA, 1934 ou nos espécimens do Dr. FIGUEIREDO, como foi anotado por ALAN STONE, a bainha do ovipositor é mais delgada, os espiráculos são mais próximos, i. é. 0,705 mm., o ovipositor é mais estreito, i. é, 0,12 mm., e finalmente a ponte do ovipositor é completamente serrilhada.

Mas deve também estar claro, no quadro n.º 1, que em nenhum dêsses exemplares as razões 1.ª e 2.ª alcançam ou sejam exatamente semelhantes às relações dadas por LOEW para a sua *consobrina*. Contudo, o autor pelo menos observou um fator evidente e constante, i. é, a forma, o tamanho e o número de fileiras de ganchos; em *A. Zikani* COSTA LIMA, 1934, e nos espécimens do Dr. FIGUEIREDO, os dentes são delgados, fracos e comparativamente longos, cêrca de 0,15 mm., dispostos em 10-11 fileiras, enquanto em *A. consobrina* de COSTA LIMA, 1934, os ganchos têm a forma de chifres, são grossos e comparativamente muitos curtos, cêrca de 0,09 mm. em 5-6 fileiras.

Assim, a forma, o tamanho, o número das fileiras de ganchos no "rasper", as razões 3.ª e 4.ª, tomadas pelo autor e as objeções apresentadas por ALAN STONE separariam preliminarmente duas espécies bem definidas, a saber: *A. Zikani* COSTA LIMA, 1934 e os espécimens do Dr. FIGUEIREDO de um lado, e *A. consobrina* de COSTA LIMA de outro, não considerando o comprimento das asas, da bainha do ovipositor e do ovipositor, que, na opinião do autor, constituem fatores variáveis.

Quadro n.º 1

	A. Zikani, C. Lima, 1934	A. Zikani, C. Lima, 1934	A. Zikani, C. Lima, 1934	A. Consobrina, C. Lima, 1934	(espécimens do Dr. Figueiredo)		
					I	II	III
N.º das lâminas no Inst. Oswaldo Cruz	3975	2609	2115	1930	4524 4525 4526	4528 4529	4531 4532
1. Comprimento do ovipositor	5,82 mm	6,26 mm	5,32 mm	5,85 mm	6,48 mm	6,81 mm	5,76 mm
2. Comprimento da bainha do ovipositor	6,27 mm	6,48 mm	5,93 mm	6,80 mm	6,52 mm	7,23 mm	5,82 mm
3. Comprimento da ponta do ovipositor	0,39 mm	0,37 mm	0,33 mm	0,27 mm	0,41 mm	0,39 mm	0,38 mm
4. Comprimento da serrilhada da ponta do ovipositor	0,37 mm	0,36 mm	0,32 mm	0,27 mm	0,39 mm	0,38 mm	0,37 mm
5. Distância dos espiráculos à base	1,41 mm	1,29 mm	1,18 mm	0,705 mm	1,37 mm	1,47 mm	1,17 mm
6. Largura do ovipositor ..	0,13 mm	0,13 mm	0,14 mm	0,12 mm	0,16 mm	0,16 mm	0,15 mm
7. Comprimento da asa montada em lâmina	8,50 mm	9,00 mm	8,20 mm	9,50 mm	8,80 mm	9,70 mm	8,00 mm
8. Comprimento do corpo ..	7,50 mm	7,50 mm	7,00 mm	7,50 mm	7,20 mm	7,50 mm	6,60 mm
9. 1.ª razão §	1:1.19	1:1.17	1:1.18	1:1.14	1:1.15	1:1.13	1:1.18
10. 2.ª razão §§	1:1.35	1:1.38	1:1.39	1:1.39	1:1.38	1:1.35	1:1.37
11. 3.ª razão **	1:14.92	1:16.92	1:16.12	1:21.66	1:15.88	1:17.46	1:15.16
12. 4.ª razão ***	1:16.08	1:17.50	1:17.66	1:25.22	1:15.90	1:18.53	1:15.33
13. N.º de fileiras de ganchos no "rasper"	10-11	10-11	10-11	5-6	10-11	10-11	10-11

§ Relação da bainha do ovipositor com o resto do corpo.
§§ Relação da bainha do ovipositor com o comprimento das asas.
** A 3.ª e 4.ª razões foram tomadas pelo autor, a 3.ª consistindo na relação entre a ponta do ovipositor e o seu comprimento total.
*** A 4.ª é a relação entre os comprimentos da ponta do ovipositor e o do ovipositor todo.

Respeito à ondulação da nervura R2+3, conforme observou ALAN STONE, nota-se perfeitamente em *A. Zikani* COSTA LIMA, 1934, não se observando sequer vestígio dessa ondulação em *A. consobrina* de COSTA LIMA, 1934, muito embora LOEW em seu trabalho haja definidamente mencionado que "a segunda nervura longitudinal mostra vestígios de ondulação e a 3.ª nervura longitudinal é um tanto curvada além da nervura transversal posterior". A observação do autor é que ambos fatores não são constantes, já que êle constatou nos exemplares da coleção do Dr. FIGUEIREDO e também em alguns exemplares de *A. Zikani*, que principalmente na asa do exemplar n.º 2, do Dr. FIGUEIREDO é exatamente igual ou semelhante a de *A. consobrina* de COSTA LIMA, 1934, em tamanho e forma, correndo de duas nervuras longitudinais, enquanto na lâmina N.º 3 se observa exata semelhança, em todos os sentidos, com o que se vê em *A. Zikani* COSTA LIMA, 1934; e o 3.º espécime ocupa uma posição claramente intermediária. Também com respeito aos espécimens machos do Dr. FIGUEIREDO podem, neles, ser observadas as três condições, embora, como ficou provado acima, os espécimens do Dr. FIGUEIREDO sejam "in senso stricto" semelhantes a *A. Zikani* COSTA LIMA, 1934.

O autor também não concorda plenamente com a opinião de COSTA LIMA, segundo à qual em *consobrina*, 1934 a terceira nervura longitudinal é mais pronunciada, (a que LOEW diz que: a terceira nervura longitudinal é um tanto curvada além da transversal posterior,) bem como não concorda seja êste fator bom para se reconhecer a sua *consobrina* como *A. consobrina* de LOEW.

Mas esta opinião não seria bastante para chegar a qualquer conclusão sem comparar agora os fatores acima mencionados, especialmente a forma, o tamanho, o número das fileiras de ganchos no "rasper", a distância dos espiráculos à base e a largura da bainha do ovipositor, com o material típico originalmente descrito por LOEW em 1873.

Parece, porém, estranho ao autor como e porque ALAN STONE tenha denunciado a determinação do Prof. Dr. COSTA LIMA sem ver o material tipo quer de *A. consobrina* LOEW, 1873, quer de *A. Zikani* COSTA LIMA, 1934 ou de *A. consobrina* de COSTA LIMA, 1934 e apesar disso denominando *A. consobrina* de COSTA LIMA, 1934, como *A. amnis* n. sp.

Presentemente, o autor, baseado nos fatos acima relatados, não pode aceitar o ponto de vista de ALAN STONE e além disso não pode reconhecer sua nova espécie *A. amnis* ALAN STONE, 1942. Por isso está inclinado a aceitar o ponto de vista de COSTA LIMA e reconhecer

a sua *A. consobrina* como a *consobrina* de LOEW e *A. Zikani* como espécie nova, dependendo a confirmação da comparação com o material tipo de LOEW.

Se, entretanto, o material tipo de LOEW não fôr disponível ou estiver danificado ou destruido, então não resta senão concordar com a norma geralmente respeitada pelos entomologistas.

Sendo a determinação do Dr. COSTA LIMA a 1.ª depois da LOEW, deve ser considerada como o material típico de *A. consobrina* (COSTA LIMA, 1934), e conservado no Instituto Oswaldo Cruz com esse nome.

2. *Anastrepha silvai* COSTA LIMA, 1934

ALAN STONE em seu trabalho: "The fruitflies of the genus *Anastrepha*" U. S. Dept. of Agric. Misc. Publ. N.º 439, 1942, considerou esta espécie como sinônimo de *A. distincta* GREENE, 1934, descrita pouco tempo antes.

Conforme mencionou à página 107: "Specimens from Peru tend to have a somewhat longer ovipositor than others, but in every respect there is perfect agreement; and since the species has been reared from Inga in Peru, the identity of *A. distincta* and *silvai* seems certain".

Por bondade do eminente entomologista Prof. Dr. A. DA COSTA LIMA, o autor teve oportunidade de examinar tôdas as suas preparações de *A. silvai* COSTA LIMA, no Instituto Oswaldo Cruz.

O exame completo e cuidadoso de tôdas lâminas de *A. silvai* COSTA LIMA, nome posteriormente o *A. distincta* GREENE, levou o autor a acreditar que *A. silvai* COSTA LIMA, 1934, é de fato diferente de *A. distincta* GREENE, a despeito do fato de ambas se criarem em *Inga*.

ALAN STONE, dando a descrição de *A. distincta*, menciona à página 106 que em *distincta* o ovipositor tem de comprimento 2,25-3,42 mm., e que a ponta do ovipositor é longa e delgada (cêrca de 0,35 mm. de comprimento) com serrilhamento diminuto e confinado à metade apical.

O autor, como é evidente, baseou sua descrição principalmente no comprimento da ponta do ovipositor. Interpretou e entendeu o significado de palavra "about" usada por ALAN STONE para a ponta do ovipositor, como aproximadamente 0,35 mm. de comprimento, mas não mais do que isso.

Assim, o quadro N.º 1. separaria preliminarmente as duas espécies segundo o comprimento da ponta do ovipositor. Além disso um exame mais profundo revelou ao autor que a ponta do ovipositor difere ligeiramente na forma, em *A. silvai* COSTA LIMA da que se observa

QUADRO N.º 2. MOSTRANDO DIFERENTES COMPRIMENTO DA GENETÁLIA DA FÊMEA EM *A. DISTINCTA E A. SILVAI*

	ANASTREPHA SILVAI, COSTA LIMA, 1934					ANASTREPHA DISTINCTA, GREENE, 1934			
N.º das lâminas no Instituto Oswaldo Cruz	2909	2608	2136	1966	1964	2908	A. distincta Greene ++	3899	2114
1. Comprimento do ovipositor	2,31 mm	2,10 mm	2,20 mm	2,40 mm	2,40 mm	2,48 mm	2,25-3,42 mm	2,13 mm	2,37 mm
2. Comprimento da bainha do ovipositor	2,53 mm	2,57 mm	2,43 mm	2,47 mm	2,47 mm	2,52 mm	2,30-3,44 mm	2,18 mm	2,63 mm
3. Comprimento da ponta do ovipositor	0,40 mm	0,415 mm	0,40 mm	0,40 mm	0,40 mm	0,41 mm	0,35 (abbout)	0,31 mm	0,35 mm
4. Comprimento da distância do serrilhamento da ponta do ovipositor .	0,18 mm	0,18 mm	0,18 mm	0,19 mm	0,19 mm	0,18 mm		0,16 mm	0,17 mm
5. Espessura do ovipositor	0,13 mm	0,13 mm	0,12 mm	0,13 mm	0,14 mm	0,115 mm		0,115 mm	0,12 mm
6. Distância dos espiráculos à base	0,91 mm	0,10 mm	0,93 mm	0,84 mm	0,90 mm	0,99 mm		0,93 mm	0,92 mm
7. 3.ª razão ÷ ...	1: 5,77	1: 4,08	1: 5,50	1: 6,00	1: 6,00	1: 6,07	1:6,42-1:9,77	1: 6,67	1: 6,77
8. 4.ª razão ÷÷ .	1: 6,32	1: 6,19	1: 6,07	1: 6,17	1: 6,17	1: 6,17	1:6,57-1:9,82	1: 7,03	1: 7,51

** As medidas de **A. distincta**, segundo Alan Stone em seu trabalho "The fruitflies of the genus Anastrepha".
* Razão entre a distância da ponta do ovipositor e o ovipositor.
** Relação entre a ponta do ovipositor e a bainha do ovipositor.

em *A. distincta* GREENE, embora à primeira vista a diferença possa ser levada à conta da estreita semelhança. A ponta do ovipositor em *A. silvai* COSTA LIMA é nìtidamente mais alongada que em *A. distincta*, uma vez que em *A. silvai* COSTA LIMA, 1934, nunca é menor do que 0,40 mm., enquanto em *A. distincta* GREENE, como notificou ALAN STONE (e também vide lâminas N.º 3899 e 2114), o comprimento nunca é maior que 0,35 mm.

Em segundo lugar, uma comparação das lâminas de *A. silvai* COSTA LIMA com as de *A. distincta* GREENE no quadro 1, com respeito ao comprimento do serrilhamento do ovipositor revelará claramente que o comprimento em *A. silvai* COSTA LIMA, 1934, é comparativamente maior que em *A. distincta* GREENE.

E, finalmente, segundo os dados fornecidos por ALAN STONE para *A. distincta*, as razões 3.ª e 4.ª estão em média entre 6,42-9,77 e 6,57-9,82, respectivamente.

Portanto, no caso de *A. silvai*, ambas as razões são definitivamente menores, nunca alcançando o mínimo de *A. distincta*.

Pelos fatos mencionados acima, o autor não concorda com o ponto de vista de ALAN STONE, a respeito de *A. silvai* COSTA LIMA, 1934; daí estar convencido de que *A. silvai* COSTA LIMA, 1934, deve ser mantida como boa espécie e não como sinônimo de *A. distincta*, como acredita ALAN STONE.

DISCUSSION AND CONFIRMATION OF CERTAIN SPECIES OF *ANASTREPHA*

Abstract

The exact position of two disputed species viz. A. consobrina of COSTA LIMA 1934 *and A. silvai* COSTA LIMA 1934 *is discussed in this paper.*

ALAN STONE *had recognised A. Zikani* COSTA LIMA 1934 *(or A. consobrina of* COSTA LIMA 1930) *and A. consobrina of* COSTA LIMA 1934 *as A. consobrina of* COSTA LIMA 1930 *and A. amnis n. sp., respectively, mainly on the ondulation of vein R2 + 3. But acoording to the writer's observations, neither of the factor's given by* LOEW *for consobrina are constant. The only constant factor, which the writer has observed besides differences pointed by* ALAN STONE, *is in the shape, size and number of hook rows in the rasper. Thus a comparison of the writer's account along with the differences pointed by* ALAN STONE, *with the type materials described by* LOEW, *would clearly settle this disputed question. At present the*

writer has accepted the determination of COSTA LIMA *and has not recognised A. amnis* ALAN STONE n. sp., *for A. consobrina of* COSTA LIMA 1934.

Likewise ALAN STONE *recognised A. silvai* COSTA LIMA, 1934, *as new synonym of A. distincta* GREENE, 1934, *since both were reared on Inga and show much similarity. The writer's observation would, however, reveal that in A. silvai* COSTA LIMA, 1934, *the tip of the ovipositor is more than 0,4 mm long (c. f. A. distincta* GREENE, 1934 *in which, according to* ALAN STONE, *is about 0,35 mm long), slightly differently shaped, length of the serrations in the ovipositor tip is comparatively longer and 3.ª and 4.ª ratios taken by the writer do not reach to the minimum of A. distincta* GREENE, 1934. *Thus in writer's opinion, A. silvai does bear its specific genuinity and should be considered as a species and not synonym as pointed by* ALAN STONE.

BIBLIOGRAFIA

1. COSTA LIMA, A. DA, — 1934 — Moscas de frutas do gênero Anastrepha Schiner, 18-68 (Dipt: Trypetidae). Inst. Osw. Cruz. Mem. 28: 487-575.
2. GREENE, CHARLES T. — 1934 — A revision of the genus Anastrephia. (Dipt.: trypetidae). Wash. Ent. Soc. Proc. 36: 127-179, ilus.
3. STONE, ALAN., — 1942 — The fruitflies of the genus Anastrepha. U. S. Dept. of Agric. Misc. Publ. No. 439.

———o———

MÉTODO PARA ESTUDO DA SENSIBILIDADE DOS ANAERÓBIOS AOS ANTIBIÓTICOS EM CULTURA DE SUPERFÍCIE

POR

V. O. Guida

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com as estampas 4 e 5

A ação inibidora de antibióticos sôbre anaeróbios "in vitro" tem sido objeto de vários trabalhos (1-6).

Releva notar, entretanto, que em todas estas pesquisas sòmente meios líquidos ou semi-sólidos foram usados.

No presente trabalho utilizamos um método onde são estudados os efeitos de antibióticos sôbre anaeróbios, em cultura em superfície.

MATERIAL E MÉTODOS

Na superfície de placa de agar-sangue, segundo Zeissler, prèviamente semeada com o anaeróbio cuja sensibilidade aos antibióticos se quer determinar, colocam-se discos de papel de filtro impregnados com diferentes doses de antibióticos (7). As placas são, a seguir, colocadas na jarra de anaerobiose de Rodrigues (8) e incubadas na estufa a 37°C durante 48 horas.

Os discos de papel usados (*) continham 2 U. O de penicilina sódica, 30 μg de cloromicetina, 30 μg de terramicina, 30 μg de dihidrostreptomicina..

Os anaeróbios ensaiados foram amostras de *Cl. perfringens, Cl. septicum, Cl. novyi* e *Cl. putrificum,* todas pertencentes à coleção de culturas microbianas do Instituto Biológico de São Paulo.

RESULTADOS

Os resultados obtidos estão resumidos na TABELA I. Aureomicina, cloromicetina e terramicina, na dose de 30 μg inibiram a vegetação de todos os anaeróbios investigados: em tôrno dos discos formaram-se zonas circulares bem definidas, variando de 20 a 30 mm de diâmetro. A penicilina, na dose de 2 U. O, agiu apenas nas culturas de *Cl. putrificum* e de *Cl. perfringens,* produzindo zonas de inibição de 12 mm de diâmetro.

(*) Utilizamos discos preparados pelo Dr. Augusto E. Taunay, Chefe da Seção de Bacteriologia do Inst. Adolfo Lutz e que nos foram gentilmente cedidos por êste pesquisador.

TABELA I

Resultados da ação de antibióticos sôbre anaeróbios, em cultura em superfície.

Antibióticos empregados	Dose	ZONAS DE INIBIÇÃO (em mm.)			
		Cl. putrificum	Cl. novyi	Cl. perfringens	Cl. septicum
Aureomicina	30 μg	20	20	20	22
Cloromicetina	30 μg	25	20	22	26
Terramicina	30 μg	28	30	25	30
Penicilina	2 U. O	12	0	12	0
Dihidrostreptomicina ..	30 μg	0	0	0	0

A dihidrostreptomicina não mostrou efeito inibidor sôbre qualquer das bactérias estudadas.

A FOTO 1 mostra as zonas de inibição do *Cl. putrificum*, produzidas pela aureomicina, cloromicetina, terramicina, dihidrostreptomicina e penicilina na superfície de ágar-sangue.

A FOTO 2 mostra o efeito dos mesmos antibióticos sôbre o *Cl. novyi*, produtor de hemolisina. Nêste caso, aparecem em tôrno dos discos círculos escuros, que correspondem às zonas de inibição de crescimento, onde as hemátias ficaram intactas.

Na FOTO 3 vê-se o resultado da ação dos antibióticos sôbre o *Cl. perfringens*, também altamente hemolítico. Verifica-se, igualmente, a existência de zonas de inibição perfeitamente definidas, que correspondem aos círculos escuros, nos quais as hemátias não foram destruidas. Finalmente, na FOTO 4 vemos o resultado da ação da aureomicina, terramicina e cloromicetina, que inibem o *Cl. septicum*, também hemolítico; 2 U. O. de penicilina e 30 μg de dihidrostreptomicina não mostraram efeito inibidor algum sôbre a mesma bactéria.

DISCUSSÃO

Não foi nosso intento, nêste trabalho, estabelecer comparações da atividade de vários antibióticos sôbre anaeróbios e sim demonstrar a possibilidade de se empregar um método simples, semelhante ao que se usa para os aeróbios em cultura em superfície. O resultado se define pela formação de zonas de inibição, cujo diâmetro varia de acôrdo com as concentrações da substância antibacteriana. E' claro que o método por nós empregado se presta muito bem para comparações da sensibilidade dos anaeróbios a um ou vários antibióticos quando se usam discos de concentrações diferentes.

RESUMO

A sensibilidade de anaeróbios aos antibióticos pode ser ensaiada utilizando-se placas de agar-sangue prèviamente semeadas e em cuja superfície são colocados discos de papel filtro contendo diferentes doses de antibióticos.

Após incubação em anaerobiose a 37°C, durante tempo adequado, verificou-se que quando o anaeróbio ensaiado tinha capacidade hemolítica, toda a superfície da placa de agar-sangue se apresentava clara, em contraste com as zonas de inibição de crescimento em tôrno dos discos, onde as hemátias não haviam sido destruidas.

Foram ensaiadas 4 amostras de anaeróbios (*Cl. putrificum, Cl. novyi, Cl. septicum* e *Cl. perfringens*) em relação a 5 antibióticos — aureomicina, cloromicetina, terramicina, dihidrostreptomicina e penicilina. Os três primeiros antibióticos na concentração de 30 μg inibiram todos os germens empregados, enquanto que 2 U. O de penicilina mostraram-se menos ativas e 30 μg de dihidrostreptomicina não demonstraram efeito algum.

A METHOD FOR STUDYING THE EFFECT OF ANTIBIOTICS ON ANAEROBES IN SURFACE CULTURES

Abstract

The purpose of this paper is to show that the sensitivity of anaerobes to antibiotics may be studied in surface cultures by the disc method, such as currently used for aerobic bacteria.

Blood agar plates are previously inoculated with the anaerobe to be tested and filter paper discs impregnated with different doses of antibiotics, are placed over the agar surface, at convenient distances from one another.

The plates prepared in this way are incubated anaerobically for 48 hours at 37°C and the diameter of the inhibition zones is measured.

In the case of hemolytic anaerobes, such as Cl. perfringens, Cl. novyi, and Cl. septicum, the whole surface of the blood agar is clear, except around the discs, where there is no bacteria growth. The following anaerobes have been assayed — Cl. putrificum, Cl. novyi, Cl. septicum and Cl. perfringens, the susceptibilities of which were tested against aureomycin, chloromycetin, terramycin, dihydrostreptomycin and penicillin. The three first antibiotics in a dose of 30 μg per disc exerted inhibitory action against all bacteria tested.

Two U. O of penicillin displayed a smaller inhibitory power and 30 µg of dihydrostreptomycin did not inhibit the growth of any of the bacteria tested.

BIBLIOGRAFIA

1) Mac Kee, M. C., Hamre, M. D. and Rake, G. 1942 — The Action of Antibiotics on organism producing gas gangrene. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 50: 277.

2) Prévot, A. R. and Jones, H. 1946 — *Bull. Acad. Méd.*, Paris, 130: 123. Citado por A. Fleming. A Penicilina e suas aplicações práticas. Tradução do Instituto Progresso Editorial S/A. 1947, pg. 117.

3) Bliss, A. E. and Todd, P. H. 1949 — A comparison of eight antibiotic agents, in vivo and in vitro. J. Bact., 58: 61.

4) Whitlock, M. C., Jr. and Tashaman, G. S. 1950 — A report on further in vitro aureomycin sensitivity tests. *J. Bact.*, 59: 314.

5) Bliss, A. E., Warth, T. P. and Chandler, A. C. 1950 — The susceptibility of Gram-positive, Gram-negative Bacilli and Clostridia to terramycin. *Annales of the New York Academy of Science*, 53: (2): 277.

6) Bliss, A. E., Warth, T. P., Chandler, C. and Long, A. P. 1950 — Studies of Terramycin, in vivo and in vitro. *Bull. Johns Hopkins Hospital*, 87: 171.

7) Vicent, J. G. and Vicent, H. W. 1944 — Filter Paper Disc modifition of the Oxford cup Penicillin Determination. *Proc. Soc. Ex. Biol. Med.*, 55: 162.

8) Rodrigues, C. 1936 — O isolamento de anaerobios em placas, modificações do processo Fortner. *Arq. Inst. Biológico*, 7 (18): 228-233.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 4

Foto 1 — Inibição do *Cl. putrificum pelos antibióticos.*
Foto 2 — Inibição do *Cl. novyi* pelos antibióticos.

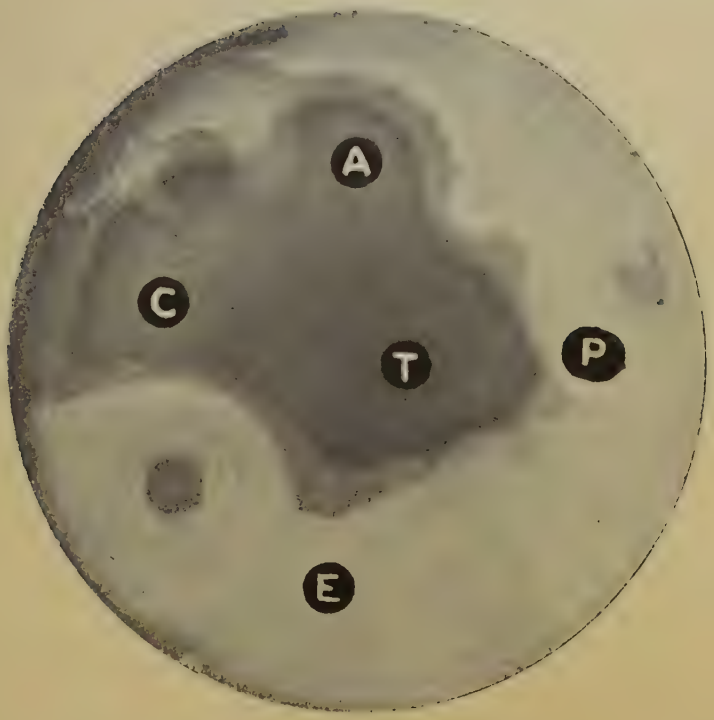
Estampa 5

Foto 3 — Inibição do *Cl. perfringens* pelos antibióticos.
Foto 4 — Inibição do *Cl. septicum pelos antibióticos.*

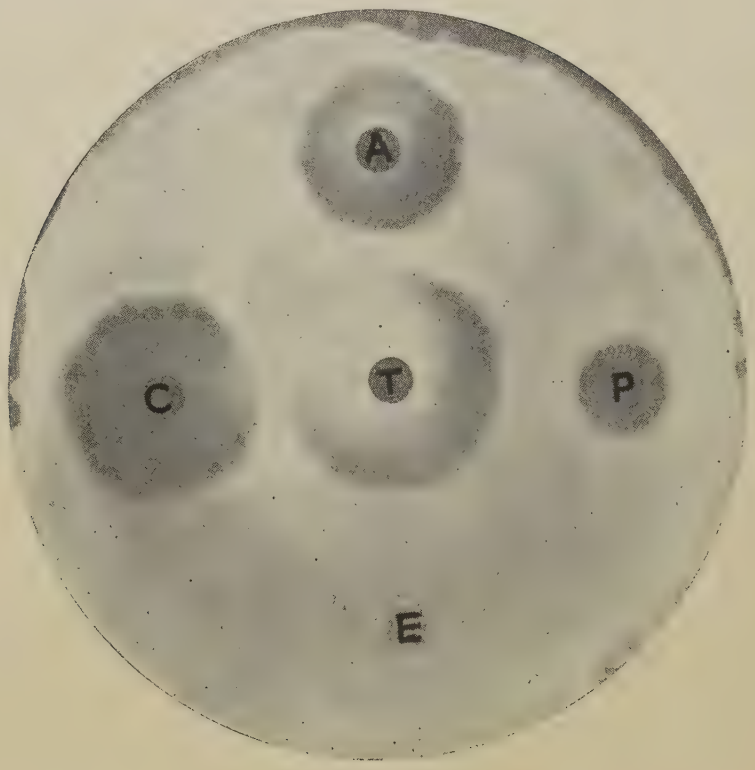
Discos de papel de filtro, contendo antibióticos, foram colocados na superfície de ágar-sangue, préviamente semeada com os anaeróbios acima indicados.

A — Disco contendo 30 ug de aureomicina.
C — Disco contendo 30 ug de cloromicetina.
E — Disco contendo 30 ug de dihidrostreptomicina.
P — Disco contendo 2 U. O de penicilina sódica.
T — Disco contendo 30 ug de teramicina.

1



2



3

4

Vol. 22 — Artigo 6 Junho de 1955

TOXOPLASMOSE ESPONTÂNEA DE GALINHA (*)

POR

P. Nóbrega, E. Trapp e M. Giovannoni

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com as estampas 6 e 7

A única referência na literatura à toxoplasmose espontânea de galinha, com isolamento e identificação do parasita, é a de ERICHSEN e HARBOE que observam doença, com duração de várias semanas sem sintomas característicos exceto cegueira ocasional. Num lote de 35 aves adultas o toxoplasma foi demonstrado histológicamente em 5 e isolado de 3 casos, através inoculação em camundongos. As lesões encontradas foram pericardite, encefalite focal necrotizante, hepatite necrotica e gastrenterite ulcerativa. Em três casos observou-se coroidite difusa, não associada todavia com a presença de parasita nos olhos afetados.

EPIZOOTIA EM FRANGUINHOS

No decorrer do mês de dezembro de 1953, tivemos ocasião de observar grave epizootia de toxoplasmose num lote 600 franguinhos New-Hampshire, de 2-3 meses de idade; a mortalidade total foi de 50% alcançando todavia 100% dos animais que apresentaram sintomas da doença. Com efeito, dos 296 franguinhos que adoeceram no período de 2 a 29 de dezembro, todos vieram a morrer após 4-5 dias de doença, durante os quais apresentaram sintomas muito semelhantes aos da coccideose aguda, tais como tristeza, arrepiamento, asas caídas e olhos fechados; as fezes todavia, eram sempre esbranquiçadas. Um dos franguinhos apresentou ainda acentuada conjuntivite unilateral não associada todavia com a presença do toxoplasma na secreação ocular ou no raspado da conjuntiva. Apenas 2 animais morreram após a fase aguda da doença, um em 14-1-54 com sintomas de paralisia e outro em 31-3-54 sem lesões aparentes. De ambos, o toxoplasma foi isolado exclusivamente do cérebro, por inoculação intraperitonial de camundongos.

Dos animais com sintomas visíveis da doença, apenas um se restabeleceu depois de apresentar durante três dias inapetência, tristeza, arrepiamento, sonolência e cabeça debaixo da asa. Sacrificado um mês depois, foi possível isolar o toxoplasma apenas do cérebro.

(*) Uma nota prévia dêste trabalho foi apresentado ao II Congresso Panamericano de Medicina Veterinária realizado em São Paulo no período de 3 a 10 de abril de 1954.

Os restantes franguinhos do lote, em número de 302, não apresentaram manifestações de qualquer espécie, mas muitos dêles tiveram infecção inaparente, conforme demonstraremos mais adiante.

LESÕES ANÁTOMO-PATOLÓGICAS

Os principais achados de autópsia foram os seguintes: fígado e baço aumentados de volume e com focos necróticos; coração pálido e com nódulos branco-amarelados variáveis em número e tamanho; pulmão com áreas extensas de congestão e consolidação.

Quanto às lesões microscópicas foram observadas nos seguintes órgãos:

1. *Coração*: Pericardite e miocardite intersticial com grande infiltração de células mononucleares entre as fibras. Os aglomerados de toxoplasmas não são tão abundantes como em outros órgãos, mas grupos típicos de parasitas foram encontrados entre as fibras, dispostos no sentido longitudinal (Fig. A).

2. *Pulmão*: As lesões dêste órgão variam desde o edema inflamatório intersticial e infiltração do parênquima e interstícios por células mononucleares até processo pneumônico mais adiantado, com hiperemia dos capilares dos septos, presença de numerosas células mononucleares e áreas necróticas focais com detritos nucleares. Grupos de toxoplasmas podem ser vistos no interior de células mononucleares, no tecido intersticial (Fig. B).

3. *Fígado*: Em alguns casos observa-se apenas ligeira proliferação linfocitária ao redor dos vasos; na maioria das vêzes, todavia, há proliferação do tecido linfóide perivascular e necroses salpicadas focais com infiltração perifocal de células redondas. Êstes focos podem apresentar necrose central de coagulação. Os parasitas são em geral abundantes na zona de infiltração ao redor das áreas necróticas, e podem ser vistos em grupo ou formações isoladas (Fig. C).

4. *Baço:* Proliferação linfocitária ao redor dos vasos; áreas extensas e confluentes de necrose de coagulação. Toxoplasmas presentes em grande número, isolados ou em grupos, não apenas nas áreas afetadas como também no tecido subcapsular (Fig. D).

5. *Cérebro*: Em geral sem lesões, pois apenas num único caso observamos pequenos focos de necrose, sem reação inflamatória. Não pudemos evidenciar o toxoplasma nos cortes histológicos.

6. *Outros órgãos*: Não foram encontradas lesões nos órgãos do aparelho digestivo.

7. *Lesões associadas*: Um dos franguinhos com toxoplasmose apresentava simultâneamente lesões de coccideose cecal, e outro, lesões de leucose linfóide no fígado, baço e coração. Todos os outros animais representavam casos puros de toxoplasmose.

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO *TOXOPLASMA GONDII*

O *Toxoplasma gondii* foi identificado em 10 de 15 franguinhos que foram enviados ao Instituto Biológico em diferentes dias após o início do doença. O parasita foi reconhecido nas seguintes condições:

a) Em exames a fresco de preparados do pulmão, nos casos com lesões acentuadas dêste órgão;

b) Nos esfregaços do fígado, baço e pulmão corados pelo metodo de Giemsa;

c) Nos cortes histológicos de fígado, baço, coração e pulmão, porém não do cérebro;

d) Isolamento por inoculação intraperitonial de camundongos com suspensões em água fisiológica do fígado, baço e pulmão; nos casos positivos a morte dos animais ocorria em geral de 9 a 13 dias após a inoculação, encontrando-se o parasita em grande quantidade no exsudato peritonial.

Nos três casos a que já fizemos referência, um dos quais se restabeleceu e outros dois morreram 1 e 3 meses respectivamente após o início da epizootia, o isolamento do toxoplasma sómente foi possível a partir do cérebro, mas não do fígado, baço ou pulmão.

A cepa de *Toxoplasma gondii*, por nós isolada de galinha, se comporta biológica e imunológicamente como a que isolamos anteriormente de pombo, a qual por sua vez não se distingue da cepa proveniente de mamíferos, conforme demonstramos préviamente (2). Assim a amostra isolada de galinha mata coelhos inoculados no peritônio e pombos inoculados no músculo em 5-7 e 12-14 dias respectivamente: todavia, 4 coelhos e 4 pombos imunes ao toxoplasma de pombo (animais que sobreviveram à infecção devido ao tratamento por sulfadiazina) resistiram também à inoculação de doses maciças do toxoplasma isolado de galinha. Além disso, soros imunes de coelhos e pombos e que deram reação positiva de SABIN-FELDMAN ("dye test") com o antígeno preparado com toxoplasma de pombo, reagem no mesmo título com antígenos preparados com toxoplasma de galinha.

COMPORTAMENTO DOS FRANGUINHOS SOBREVIVENTES

Como já referimos inicialmente, do lote de 600 franguinhos morreram 298, restando 302 animais da mesma idade e que não obstante

a criação em estreito confinamento e portanto em contacto imediato com as aves doentes, não apresentaram manifestações de qualquer espécie. Examinamos 30 dêstes franguinhos 4 a 6 meses após a epizootia e a pesquiza de toxoplasma, por inoculação intraperitonial dos camundongos foi negativa no fígado e baço, mas positiva em grande número de casos no cérebro, como se pode ver do seguinte quadro.

TABELA 1

Pesquisa de toxoplasma, por inoculação em camundongos, de cérebro de franguinhos aparentemente normais, criados juntos com os pintos mortos de toxoplasmose em dezembro de 1953.

N.º de frangos	Data do exame	Toxoplasma no cérebro	% de isolamento
10	30-4-54	8	80
2	17-5-54	2	100
10	18-5-54	8	80
8	16-6-54	5	62
30	—	23	76,6

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE GALINHAS

20 franguinhos de 2-3 meses de idade são inoculados na traquéia com suspensão de exsudato peritonial de camundongos, infectado com toxoplasma de galinha; outros 20 franguinhos são inoculados no músculo com a mesma suspensão, rica em toxoplasmas. Não houve qualquer manifestação da doença, durante um período de observação de 6 mêses. Dos animais inoculados na traquéia, 10 foram sacrificados 5 a 6 meses depois, sendo reisolado o toxoplasma do cérebro, em 2 casos.

PESQUISA DE ANTICORPOS

Com os soros de aves com toxoplasmose espontânea ou inoculadas experimentalmente, pesquisamos anticorpos fixadores de complemento usando a técnica de SABIN (3) e fizemos o teste do corante de SABIN e FELDMAN (4).

O teste de fixação do complemento foi inteiramente negativo, tanto em relação às aves mortas espontâneamente de toxoplasmose ou que apresentavam toxoplasma no cérebro, em exames feitos 4 a 6

meses após o início da epizootia, como também em relação às aves experimentalmente infectadas por via intratraqueal ou intramuscular, cujo sôro examinado 30 dias após a infecção se mostrou completamente destituido de anticorpos fixadores do complemento.

Quanto ao teste do corante, nossos resultados confirmam plenamente as observações de ERICHSON e HARBOE, isto é, o título de anticorpos pode ser negativo em aves certamente infectadas ou então positivo em baixas diluições de 1:4 a 1:32. Resultados idênticos se observam com o sôro de frangos inoculados no músculo ou traquéia com doses maciças de toxoplasma. Quanto às aves normais, o teste de SABIN-FELDMAN foi negativo em todos os casos, mesmo na diluição 1:2. O quadro abaixo resume os resultados obtidos:

TABELA 2

Reação de Sabin-Feldman em galinhas com toxoplasmose espontânea, infectadas experimentalmente e normais.

N.º de aves	Tipo da infecção	Dias após a infecção	Título de sôro
10	espontânea (aguda)	3 a 30 dias	0(6);1:4(1);1:32(3)
44*	espontânea (assintomática)	4 a 6 mêses	0(25);1:4(4);1:8(3);1:16(7);1:32(5)
28	experimental	20 a 30 dias	0(20);1:4(1);1:8(5);1:16(1);1:32(1)
50	normais	—	Todos negativos na diluição 1:2

(*) Não apresentaram manifestações da doença, mas o toxoplasma foi isolado do cérebro em 76,6% dos casos.

SPONTANEOUS TOXOPLASMOSIS IN THE DOMESTIC FOWL

Abstract

The only reference in the litterature to spontaneous toxoplasmosis in the domestic fowl, with isolation and identification of the parasite, is the one of Erichson and Harboe (1) who described a disease in fowls, which lasted for several weeks and developed without characteristic symptoms, although occasionally causing blindness. In a flock of 35 birds the parasite was histologically demonstrated in 5 and isolated from 3 cases, through mouse inoculation. The lesions found were pericarditis, focal and diffuse myocarditis, necrotizing focal

encephalitis, necrotic hepatitis and ulcerative gastro-enteritis. In 3 cases a diffuse choroiditis was noticed; however the parasite was not found in the diseased eyes.

AN OUTBREAK AMONG CHICKS

During december 1953 we had the opportunity to observe a severe outbreak of toxoplasmosis in a flock of 600 New Hampshire pullets, aged 2-3 months; the total mortality rate was 50% and almost 100% of the flock was affected by the disease.

Contrarily to what was observed by Erichsen and Arboe, the evolution of the disease was rapid, taking from 4-5 days. The symptoms were quite similar to those of acute coccidiosis, except as to the aspect of the stools, which were always whitish. One of the chicks showed marked unilateral conjunctivitis not associated with the presense of the parasite. The principal autopsy findings were: liver and spleen enlarged and with necrotic foci; heart pale and with yellowish-white nodules which varied in number and size, lungs with extensive areas of congestion and consolidation.

Microscopically, the main lesions where those of intersticial myocarditis, with a diffuse infiltration of mononuclear cells, and inflammatory alterations in the lungs, ranging from intersticial inflammatory edema with both parenchymal and intersticial infiltration of mononuclear cells to a more advanced pneumonic process, with capillary hyperhemia, abundance of mononuclear cells and areas of necrosis. Inflammatory and necrotic lesions were also common in the liver and spleen.

We were able to find the toxoplasma in 10 out of 15 chicks received at the laboratory at different stages of the disease. In the cases that showed marked pulmonary lesions the toxoplasmas could be easily recognized in large number in fresh preparations of the lungs and in smears of liver, spleen and lungs stained with Giemsa. In all the 10 cases we also found the parasite in the histologic sections of the liver, spleen, heart and lungs, but not in the central nervous system. However, one of the animals, when examined 45 days after the onset of the outbreak, showed toxoplasma in the brain, as revealed by means of inoculation into mice, but not in the liver, spleen and lungs.

From the cockerels and pullets of the same yard, which showed no symptoms of the disease it was possible to isolate the toxoplasma through mouse intracerebral inoculation, in 76.6% of the examined animals, from 4 to 6 months after the onset of the epizootics.

The toxoplasmas isolated from the 10 cases, through mouse inoculation of suspensions of liver, spleen, lungs and heart of diseased animals, behaved biologically and immunologically as the one isolated from pigeons, which cannot be distinguished from the one isolated from mammals, as previously demonstrated by us. (2).

As well as Erichsen and Harboe, we were not able to induce systemic infections in pullets experimentally inoculated, by intramuscular and intratracheal route, with peritoneal exudate from mice harbouring many toxoplasmas. However, in 20% of the cases the toxoplasma was again isolated from the brain of pullets inoculated by intratracheal route.

The sera of the pullets with acute as well as asymptomatic spontaneous toxoplasmosis, and of the pullets inoculated by intramuscular, endotracheal or endovenous route with massive doses of toxoplasma are negative to the Sabin Feldman test (dye test) or only positive at low titles (1:32 at the maximum). The test was negative with normal birds, which numbered 50, even when their sera were diluted to 1:2. In no case the presence of complement fixing antibodies was demonstrated.

BIBLIOGRAFIA

1. Erichsen, S. e A. Harboe — 1953 — Toxoplasmosis in chickens, VI Int. Cong. for Microb., Roma e Acta Path. a. Microb. Scandin., 33: 56-71.
2. Nobrega, P. e J. Reis — 1942 — Identidade dos toxoplasmas de aves e de mamíferos, Arq. Inst. Biol. São Paulo, **13**: 21-28.
3. Sabin, A. B. — 1949 — Complement fixation test in toxoplasmosis and persistency of the antibody in human beings. Pediatrics, 4:443-453.
4. Sabin, A. B. e H. A. Feldman — 1948 — Dyes as microchemical indications of a new immunity phenomen affecting a protozoon parasite (toxoplasma), Science, **108**: 660-663.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa — 6 —

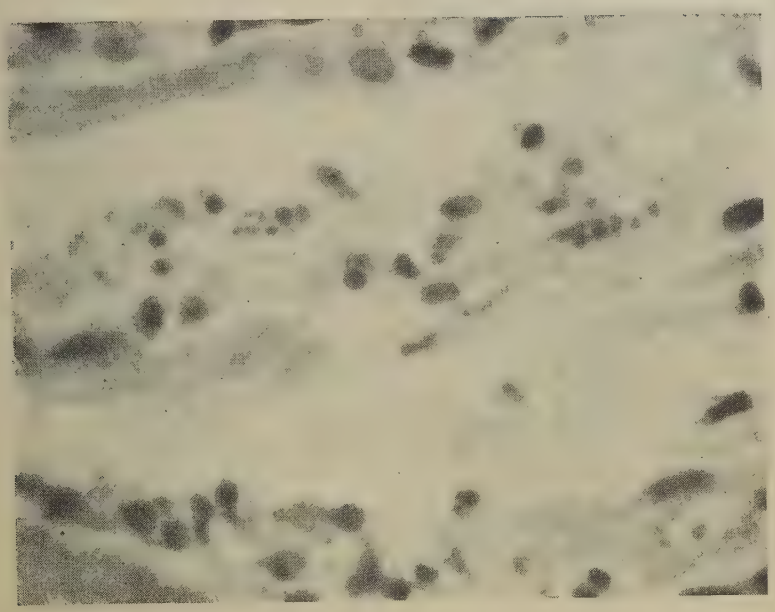
Fig. A — Coração de franguinho morto de toxoplasmose aguda. Vêm-se grupos de toxoplasmas dispostos no sentido longitudinal das fibras. (x 900).

Fig. B — Pulmão de franguinho com toxoplasmose. Vê-se um acúmulo de toxoplasmas no tecido interlobular. (x 900).

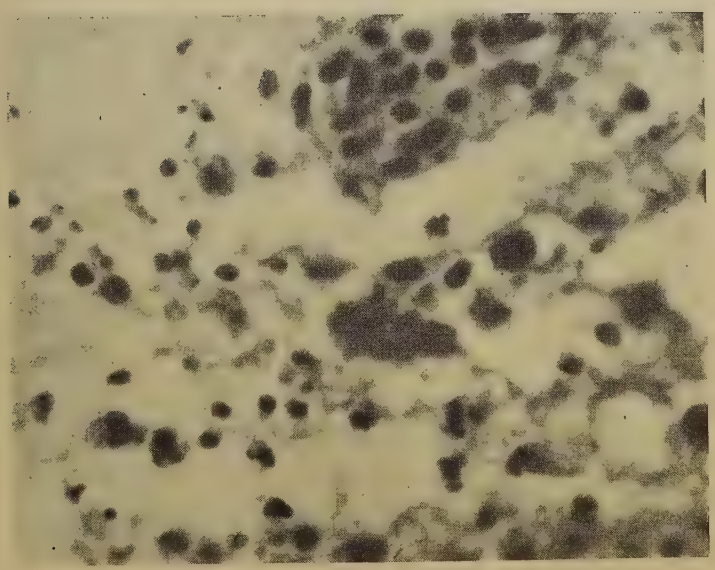
Estampa — 7 —

Fig. C — Fígado de pinto morto de toxoplasmose. Vêm-se numerosos toxoplasmas em grupos e isolados e grande proliferação de tecido conjuntivo no espaço porta. (x 900).

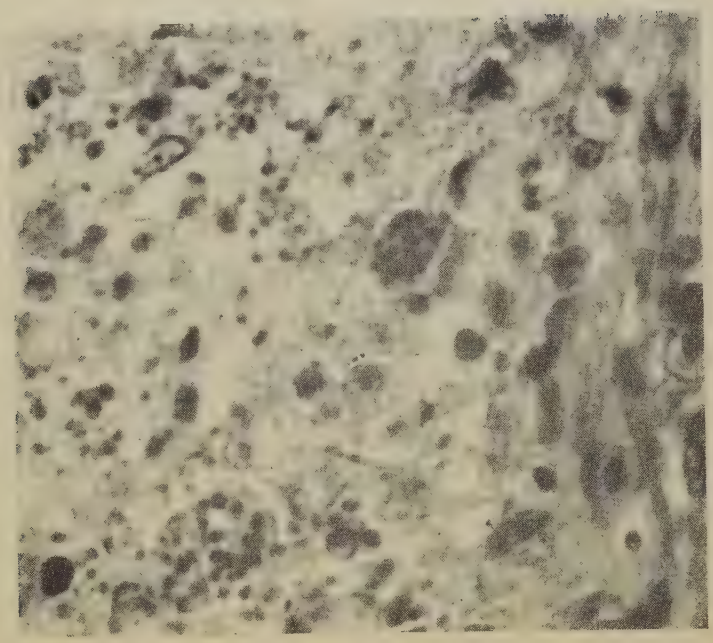
Fig. D — Baço de pinto com toxoplasmose. Vê-se um grupo de toxoplasmas logo abaixo da cápsula. (x 700).



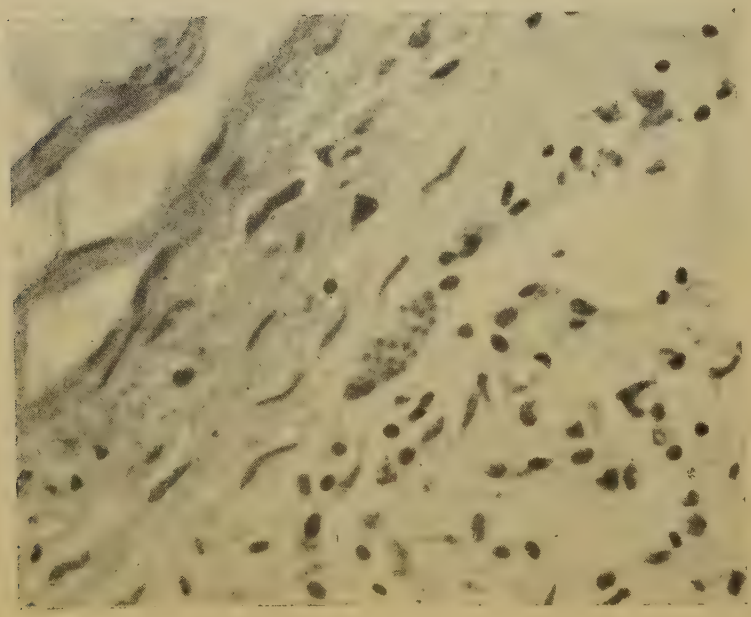
A



B



C



D

Vol. 22 — Artigo 7 Julho de 1955

ANTAGONISMO "IN VITRO" DE MICROORGANISMOS SAPRÓFITAS DO SÓLO (BACTÉRIAS, FUNGOS E ACTINOMICETOS) SÔBRE O *B. ANTHRACIS*

POR

V. O. Guida

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com a estampa 8

É sabido que os esporos bacterianos podem resistir no sólo durante longos períodos de tempo. No que concerne aos microorganismos patogênicos, tal fato se verifica com o *B. anthracis*, como com numerosos *Clostridia*, tais como o *Cl. tetani*, o *Cl. botulinum*, o *Cl. chauvoei*, o *Cl. perfringens* etc.

Desde PASTEUR (1877), foi verificada a existência de antagonismo entre numerosos micróbios e o *B. anthracis*. Posteriormente, vários autores continuaram no mesmo sentido, "in vivo" e "in vitro". Assim, PAULOWSKY (1), em 1887, constatou o antagonismo entre o *B. anthracis* e o *pneumobacille de Friedländer;* EMMERICH, em 1887, do *Streptococcus* da erisipela; BOUCHARD, em 1889, do bacilo piociânico. Êste último germe produz um antibiótico, a piocianase, utilizado por FORTINEAU (2) e SILBERSCHMIDT (3) para o tratamento da pústula maligna.

Em 1934, URBAIN e KOWARSKI (4) pesquisaram a ação antagônica do *Staphylococcus albus, Salmonella typhosa, Salm. paratyphi, E. coli, B. proteus* e da *P. avicida* sôbre o bacilo do carbúnculo hemático.

Numerosas observações se seguiram sôbre a atividade de antibióticos derivados de fungos, bactérias e actinomicetos sôbre o *B. anthracis*. Assim, a penicilina, a aureomicina, a estreptomicina, etc., demonstraram, quer "in vivo", quer "in vitro", uma ação efetiva sôbre a mesma bactéria.

A finalidade do presente trabalho é estudar a ação de germens esporulados saprófitas da terra sôbre o *B. anthracis* "in vitro" com o objetivo de esclarecer até certo ponto a questão dos "campos malditos", considerados assim em virtude da morte de animais carbunculosos nêsses locais.

MATERIAL E MÉTODOS

Para estudo do antagonismo foram utilizadas as seguintes amostras:

B. anthracis n.º 0691 — Coleção da Seção de Bacteriologia do Inst. Biológico.

B. megatherium n.º 1 — Isolado na Seção de Bacteriologia do Inst. Biológico.

B. cereus n.os 4, 5, 6, 10, 16, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 27, 29, 31, 32, 35, 36, 43, 44, 56, 59, 71, 77. Amostras isoladas de poeira na Seção de Bacteriologia do Instituto Biológico.

B. cereus n.º 46 — Procedência: Bureau of Plant Industry U.S.D.A. Washington, D. C. Nathan R. Smith. Amostra n.º 231. Indicações: A.T.C.C. n.º 6633.

B. cereus n.º 47 — Procedência: Bureau of Plant Industry U.S.D.A. Amostra 201, enviada por Nathan R. Smith.

B. cereus n.º 52 — Procedência: Seção de Patologia Veterinária, fornecida pelo Dr. A. M. Penha.

B. cereus n.º 55 — Procedência: Universidade Nacional de Tucumán, Argentina. Amostra n.º 51.

B. cereus n.º 57 — Procedência: Seção de Ornitopatologia do Inst. Biológico.

B. cereus n.os 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 310, 318, 319, 320. Amostras isoladas de terra, procedentes do local onde são enterrados os animais de experiências do Inst. Biológico.

B. megatherium n.os 1 e 58 — Isolados na Seção de Bacteriologia do Inst. Biológico.

B. megatherium n.º 67 — Procedência: Bureau of Plant Industry U.S.A. Amostra 234, enviada por Nathan R. Smith.

B. pumilus n.os 11, 13, 14, 15, 30, 40, 42, 43, 70, 80 e 86 — isolados na Seleção de Bacteriologia do Inst. Biológico.

B. pumilus n.º 88 — Procedência: Bureau of Plant Industry. Amostra 272, enviada por Nathan R. Smith.

B. pumilus n.º 307 — Isolado do sólo. Seção de Bacteriologia do Inst. Biológico.

B. licheniformis n.os 23 45 e 81 — Isolados na Seção de Bacteriologia do Inst. Biológico.

B. licheniformis n.º 93 — Procedência: Bureau of Plant Industry Amostra 1264, enviada por Nathan R. Smith.

B. mycoides n.º 26 — Isolado na Seção de Bacteriologia do Inst. Biológico.

B. mycoides n.º 60 — Procedência: Bureau of Plant Industry. Amostra *B. cereus* variedade *mycoide* n.º 233. Enviada por Nathan R. Smith.

B. mycoides n.os 308 e 309 — Isolados do sólo. Seção de Bacteriologia do Inst. Biológico.

B. alvei n.º 50 — Isolado na Seção de Bacteriologia do Inst. Biológico.

B. alvei n.º 99 — Procedência: Bureau of Plant Industry. Amostra n.º 770. Enviada por Nathan R. Smith.

B. subtilis n.º 61 — Procedência Bureau of Plant Industry. Amostra n.º 231. Enviada por Nathan R. Smith.

B. subtilis n.ºs 62 e 83 — Isolados na Seção de Bacteriologia do Inst. Biológico.

B. subtilis n.º 63 — Procedência: Seção de Patologia Veterinária do Inst. Biológico. Oferta de A. M. Penha.

B. sphaericus n.º 72 — Procedência: Bureau of Plant Industry U.S.A. Amostra n.º 339, *B. sphaericus* var. *fusiformis.* Enviada por Nathan R. Smith.

S. sphaericus n.º 74 — Procedência: Bureau of Plant Industry U.S.A. Amostra n.º 334. Enviada por Nathan R. Smith.

B. sphaericus n.º 75 — Procedência: Bureau of Plant Industry U.S.A. Amostra n.º 672, B. *sphaericus* var. *Lochnisii.* Enviada por Nathan R. Smith.

B. sphaericus n.º 76 — Procedência: Bureau of Plant Industry U.S.A. Amostra n.º 633. *B. sphaericus* var. *rotans.* Enviada por Nathan R. Smith.

B. sphaericus n.º 79 — Procedência: Seção de Patologia Veterinária do Inst. Biológico.

B. sphaericus n.ºs 312, 313, 315 e 316. — Isolados do sólo. Seção de Bacteriologia do Inst. Biológico.

B. brevis n.º 87 — Procedência: Bureau of Plant Industry U. S. A. Amostra n.º 605. Enviada por Nathan R. Smith.

B. laterosporus n.º 90 — Procedência: Bureau of Plant Industry U.S.A. Amostra n.º 340. Enviada por Nathan R. Smith.

B. lentus n.º 92 — Procedência: Bureau of Plant Industry U. S. A. Amostra n.º 670. Enviada por Nathan R. Smith.

B. circulans n.º 94 — Procedência: Bureau of Plant Industry U. S. A. Amostra n.º 358. Enviada por Nathan R. Smith.

B. firmus n.º 95 — Procedência: Bureau of Plant Industry U. S. A. Amostra n.º 613. Enviada por Nathan R. Smith.

B. coagulans n.º 98 — Procedência: Bureau of Plant Industry U. S. A. Amostra n.º 770. Enviada por Nathan R. Smith.

B. polymyxa n.º 152 — Procedência: N.C.T.C. Amostra n.º 4747.

Penicillium notatum — Isolada na Seção de Bacteriologia de resíduos de fermentação de penicilina, utilizados na alimentação de animais.

Streptomyces sp. — Isolado do sólo na Seção de Bacteriologia do Inst. Biológico.

Para se verificar a antibiose "in vitro" foram usados dois métodos:

a) Semeadura do *B. anthracis* na superfície de placas de agar-batata, seguida, logo após, pela semeadura em círculo, com um toque da agulha de platina, dos saprófitas esporulados a serem estudados;

b) Semeadura do saprófita numa estria longitudinal, acompanhando o diâmetro da placa. Semeadura do *B. anthracis* em estria perpendicular à primeira. As placas eram incubadas na estufa a 37° C durante 24 horas.

QUADRO I
ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE MICROORGANISMOS SAPRÓFITAS DE SÓLO SÔBRE O *B. ANTHRACIS*

AMOSTRAS ATIVAS	AMOSTRAS INATIVAS
B. cereus n.os 4, 5, 10, 16, 19, 20, 21, 22, 24, 32, 47, 52, 55, 56, 57, 59, 71, 77, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 307, 310, 318, 319, 320.	*B. cereus* n.os 6, 25, 27, 29, 31, 35, 36, 43, 44, 46, 306, 314.
B. megatherium n.os 1, 58, 67.	
B. pumilus n.os 13, 14, 15, 40, 42, 86, 88, 307.	*B. pumilus* n.os 11, 30, 43, 70, 96.
B. subtilis n.os 61, 62, 63, 83.	
	B. sphaericus n.os 72, 74, 75, 76, 79, 312, 313, 315, 316.
B. licheniformis n.° 93.	*B. licheniformis* n.os 23, 45, 81.
B. mycoides n.os 308, 309.	*B. mycoides* n.os 26, 60.
B. alvei n.° 50.	*B. alvei* n.° 99.
B. brevis n.° 87.	*B. polymyxa* n.° 152.
B. firmus n.° 95.	*B. laterosporus* n.° 90.
B. coagulans n.° 98.	*B. lentus* n.° 92.
Streptomyces SC n.° 37.	*B. circulans* n.° 94.
P. notatum n.° 10.	

RESULTADOS

Os resultados da semeadura simultânea em placas de germes saprófitas e do *B. anthracis* demonstraram que, entre os primeiros, existem numerosos microorganismos capazes de inibir "in vitro" o bacilo do carbúnculo.

Como todos eles têm seu "habitat" na terra, onde normalmente são encontrados, é claro que êsse fato assume carater importante porque demonstra a possibilidade do *B. anthracis* ser destruído no sólo, como, aliás, acontece com outras bactérias patogênicas.

No QUADRO I estão expostos os resultados obtidos com as semeaduras simultâneas de *B. anthracis* e de vários saprófitas em placas de ágar-batata.

Podemos verificar que várias amostras do *B. cereus, B. subtilis, P. notatum,* etc., inibem a vegetação do *B. anthracis.*

DISCUSSÃO

As pesquisas levadas a efeito nêste trabalho, demonstraram que numerosos saprófitas esporulados do sólo exercem ação antagônica sôbre o *B. anthracis.*

É fato conhecido na literatura que, em virtude da grande resistência de seus esporos, o *B. anthracis* é capaz de sobreviver no sólo por um período muito longo, ao contrário de outros germens patogênicos não esporulados que resistem aí por um tempo muito curto, devido a vários fatores, inclusive a competição de outros microorganismos que habitam o mesmo substrato.

Pesquisas levadas a efeito nêste trabalho, demonstraram que saprófitas comuns na terra (fungos, actinomicetos e bactérias esporuladas) exercem "in vitro" ação antagonista sôbre o *B. anthracis,* podendo, pois, em determinadas condições, destruir no sólo essa bactéria patogênica. Nêste caso, a formação de "campos malditos" condicionada pela morte de animais carbunculosos, em determinadas regiões poderia depender, em primeira linha, da flora bacteriana coexistente, capaz de inibir ou não a bacterídia carbunculosa. Fato análogo ocorreria em sólos contaminados por *Cl. tetani, Cl. botulinum, Cl. chauvoei,* etc.

Deixamos aqui consignados nossos agradecimentos a J. Henriques, pela sua ajuda técnica.

RESUMO

Foi estudada, no presente trabalho, a atividade antagônica "in vitro" de vários saprófitas esporulados do sólo em relação ao *B. anthracis.*

Ficou demonstrado que algumas amostras de *B. cereus, B. subtilis, B. pumilus* e uma amostra de *B. brevis,* de *B. megatherium,* de *Penicilium notatum* e de *Streptomyces* sp. são capazes de inibir o *B. anthracis* enquanto que outras bactérias têm um efeito nulo.

Estes fatos sugerem que a formação dos campos malditos, provocados pela morte dos animais carbunculosos, dependeria, sobretudo, da flora bacteriana coexistente no sólo.

ANTAGONISTIC ACTION OF SAPROPHYTIC MICROORGANISMS FROM THE SOIL ON *B. ANTHRACIS*

Abstract

The antagonistic action of several saprophytic microorganisms from the soil was tested "in vitro" on B. anthracis.

It was verified that some strains of B. cereus, B. subtilis, B. pumilus, B. brevis, B. megatherium, P. notatum and Streptomyces sp. have definite inhibitory action.

The fact seems to demonstrate that the possibility of the survival of B. anthracis in the fields for any considerable periods of time, may be dependent on the antagonistic bacterial flora of the soil.

BIBLIOGRAFIA

1) Paulowsky (Citado em C. R. Société de Biologie, 115: 1085, 1943).
2) Fortineau, L. — 1910 — Note sur le traitement du charbon par la pyocianase. *Ann. Inst. Pasteur,* 24: 955.
3) Silberschmidt, W. & Schoch, E. — 1920 — Contribuition à l'étude des microbes antagonistes de la Bacteridie charbonneuse *(B. anthracis). Ann. Inst. Pasteur,* 34: 669.
4) Urbain, A & Kowarski — 1934 — Sur l'antagonisme entre diverses germens et la Bactéridie charbonneuse. *C. R. Soc. Biol. Paris,* 115: 1085.
5) Levaditi, C. & Henry, J. — 1947 — Mode d'action de la Streptomycine sur le *Bacillus anthracis* "in vitro". *C. R. Soc. Biol., Paris,* 141 (11-12): 583-584.
6) Barnes, J. M. — 1947 — Penicillin and *B. anthracis. J. Path. Bacteriol.,* 49 (1-2): 113-125.
7) Guida, V. O. — 1951 — Estudos comparativos da ação da Estreptomicina, Penicilina e Aureomicina sôbre o *"B. anthracis". Rev. Brasil. Biol.,* 11 (4): 457-466.

EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 8

Fig. 1 — Antagonismo entre *Penicillium notatum* e *B. anthracis*
Estria horizontal: *P. notatum.*
Estrias verticais: *B. anthracis.*

Fig. 2 — Antagonismo entre *Streptomyces* sp. e *B. anthracis.*
Estria horizontal: *Streptomyces* sp.
Estrias verticais: *B. anthracis.*

Fig. 3 — Antagonismo entre bactérias saprófitas esporuladas e *B. anthracis.*
Semeadura em toda a superfície da placa: *B. anthracis.*
Semeadura em círculo, com toque de alça, da esquerda para a direita: *Bacillus cereus* n.os 300 e 301 — *B. sphaericus* n.º 312 — *B. cereus* n.os 303 - 304 - 305 - 307 — *B. sphaericus* n.os 313 e 315 — *B. cereus* n.º 319.

1

2

3

Vol. 22 — Artigo 8 Agosto de 1955

ANTAGONISMO "IN VITRO" DE MICROORGANISMOS DO SOLO (BACTÉRIAS, FUNGOS E ACTINOMICETOS) SÔBRE *CLOSTRIDIA*.

POR

V. O. Guida

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com as estampas: 9, 10 e 11

Do mesmo modo que o *B. anthracis*, os anaeróbios esporulados sobrevivem no solo durante muito tempo.

Os germes produtores da gangrena gazogena (*Clostridium perfringens*, *Cl. septicum*, etc), largamente distribuidos na natureza, são frequentemente encontrados no solo e em plantas e animais em decomposição. Durante a primeira guerra mundial, assumiram grande importância, em virtude do grande número de infecções que provocaram em soldados feridos.

O *Clostridium tetani* é encontrado também frequentemente no solo, principalmente quando adubado com fezes de animais.

NICOLAÏER (1-2) demonstrou que é possível a transmissão do tétano a animais de laboratório pela simples inoculação de terra; em 140 casos, 69 apresentaram resultados positivos.

O *Cl. chauvoei*, causador da peste da manqueira em bovinos, é também apontado como capaz de sobreviver no solo durante longo tempo e provocar a doença em animais. Além dêsses, ha também o *Cl. botulinum*, capaz de, não só permanecer longo tempo no sólo, como também de produzir uma toxina que, mesmo em baixa concentração, pode provocar a morte em várias espécies animais, inclusive no homem (3).

Ao contrário do que acontece com os germes patogênicos aeróbios, em que o fenômeno de antagonismo em culturas associadas foi exaustivamente estudado, em relação a os anaeróbios muito pouco foi pesquisado. Assim, KAYUKOKA e col. (4) demonstraram que o *Streptococcus termophilus* inibe o crescimento do *Cl. botulinum* e destróe gradativamente a sua toxina; e PASSINI (5) descreveu a destruição do *B. putrificus-verrucosus* pelo *M. tuberculosis*.

Geralmente os estudos se restringem mais à destruição das toxinas produzidas pelos anaeróbios, do que própriamente a uma ação antibacteriana.

QUORTRUP e col. ([6]) verificaram que, em virtude do arejamento do solo, as bactérias aeróbias provocam a destruição da toxina produzida pelo *Cl. botulinum.*

HALL e col. ([7]) mostraram que certas bactérias aeróbias são capazes de inibir a formação de toxina botulínica "in vitro".

A mistura de *Cl. sporogenes Cl. botulinum* inibe também a formação da toxina ([8-9]) *in vitro.*

RODRIGUES e GUIDA ([10-11]) estudaram igualmente a associação de numerosas bactérias com o *Cl. tetani,* e verificaram que o *Cl. sporogenes* é capaz de interferir na formação da toxina tetânica.

Os mais importantes trabalhos encontrados na literatura médica sôbre a inibição de anaeróbios "in vitro", ou sua destruição "in vivo", se relacionam com o emprêgo de antibióticos e quimioterápicos (sulfas).

No presente trabalho estudamos a atividade antagônica de saprófitas do solo (bactérias esporuladas, fungos e actinomicetos) sôbre os anaeróbios.

MATERIAL

Usamos no presente estudo as seguintes amostras:

1) Bactérias aeróbias esporuladas:

Bacillus cereus n.º 5. Frankland y Frankland n.º 191. V. V. Ford n.º 13. Procedência: NCTC, n.º 2599. Indicações: Isolada do solo por C. A. Lamback, em 1916 (Journal Bacteriology, 1916, 1 — 493).

Bacillus cereus n.º 55. Recebida do Instituto de Microbiologia da Universidade de Tucumán, com as indicações: *Bacillus cereus* 91.

Bacillus mycoides n.º 60. Procedência: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Recebida de Nathan R. Smith. Indicações: *Bacillus cereus* var. *mycoide* n.º 233.

Bacillus subtilis n.º 155. Procedência: NCTC. Indicações: *Bacillus subtilis,* variedade *niger,* n.º 6224.

Bacillus megatherium n.º 67. Procedência: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Recebida de Nathan R. Smith. Indicações: *Bacillus megatherium* 234.

Bacillus megatherium n.º 129. Procedência. Instituto de Microbiologia da Universidade de Tucumán — Argentina. Indicações: *Bacillus megatherium* (Bac. cereus intermedium) D. B. cepa V. V. Ford n.º 19. NCTC. 2605. Obs.: Isolado por C. A. Lambach (J. Bact. 1919 — p. 493).

Bacillus sphaericus n.º 74. Procedência: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Recebida de Nathan R. Smith. Indicações: *Bacillus sphaericus* n.º 334.

Bacilus sphaericus n.º 76. Procedência: Departamento de Agriculturados Estados Unidos. Recebida de Nathan R. Smith. Indicações: *Bacillus sphaericus* var. *rotans* n.º 633.

Bacillus mascerans n.º 85. Procedência ATCC. Indicações: *Acetoethylicus* n.º 8244.

Bacillus mascerans n.º 133. Recebida do Inst. de Microbiologia da Universidade de Tucumán, Argentina. Indicações: *Bacillus mascerans* 211.

Bacillus brevis n.º 87. Procedência: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Recebida de Nathan R. Smith, com as indicações: *Bacillus brevis* n.º 605.

Bacillus brevis n.º 128. Recebida do Instituto de Microbiologia de Tucumán, Argentina. Indicações: ATCC, 10068.

Bacilus brevis n.º 159. Procedência: NCTC. Indicações: *Bacillus brevis* n.º 7577.

Bacillus pumilus n.º 88. Procedência: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Recebida de Nathan R. Smith. Indicações: *Bacillus pumilus* 272.

Bacillus pumilus n.º 134. Procedência: Instituto de Microbiologia da Universidade de Tucumán.

Bacillus laterosporus n.º 90. Procedência: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, enviada por Nathan R. Smith, com as indicações *Bacillus laterosporus* n.º 340.

Bacillus laterosporus n.º 158. Procedência: NCTC. Indicações: *Bacillus laterosporus* n.º 7579.

Bacillus lentus n.º 92. Procedência: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Indicações: *Bacillus lentus* n.º 670.

Bacillus lincheniformis n.º 93. Procedência: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Indicações: *Bacillus lincheniformis* n.º 1264.

Bacillus circulans n.º 94. Procedência: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Recebida de Nathan R. Smith, com as indicações: *Bacillus circulans* n.º 358.

Bacillus circulans n.º 127. Procedência: Inst. de Microbiologia da Universidade de Tucumán.

Bacillus firmus n.º 95. Procedência: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Indicações: *Bacillus firmus* n.º 613.

Bacillus coagulans n.º 98. Procedência: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Recebida de Nathan R. Smith, com as indicações: *Bacillus coagulans* n.º 770.

Bacillus alvei n.º 99. Procedência: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Recebida de Nathan R. Smith, com as indicações: *Bacillus alvei* n.º 811.

Bacillus alvei n.º 156. Procedência: NCTC. Indicações: *Bacillus alvei* n.º 7987.

Bacillus anthracis n.º 114. Protocolo da Seção de Bacteriologia n.º 0690. Procedência: Seção de Patologia Veterinária. Oferta do Sr. Hilton França. Isolada de canela de bovino.

Bacillus polymyxa n.º 152. Procedência: NCTC. Indicações: *Bacillus polymyxa* n.º 4747.

2) Fungos:

Penicillium notatum. Isolado na Seção de Bacteriologia do Inst. Biológico.

Aspergillus luteus. Da coleção da Seção de Fitopatologia do Inst. Biológico.

Aspergillus niger. Procedência: Coleção da Seção de Fitopatologia do Inst. Biológico.

3) *Streptomyces*:

Streptomyces sp. Procedência: Seção de Higiene Comparada do Inst. Biológico.

4) *Clostridia*:

Clostridium septicum A3. Indicação: *Oedematis maligni II.* ATCC, n.º 680.

Clostridium perfringens AK3. Recebida em 2-2-1930, de Zeissler, Altona, Alemanha.

Clostridium botulinum A15. Recebida do Dr. Paulo Nobrega em 19-1-47. Originária de Zeissler, Altona, Alemanha.

Clostridium tetani AE. Amostra 60 de Zeissler, C. f. B. 1929, 110, 24-44.

Clostridium chauvoei A43. Isolada da vacina preparada no Inst. O. Cruz, em 1931.

Clostridium putrificus tenuis AA. Indicações: Zbl. f. Bakt., 1929, Cx, 1/2, 24-44. Zeissler e Ranfeld.

Clostridium sporogenes A34. Indicações: Bacille sporogenes Weinberg; recebida em 25-5-1929.

Clostridium novyi 60. Indicações: Recebida de Zeissler, em 26-12-1929, sob a designação *Bacillus novyi* 60.

MÉTODOS

Antagonismo entre bactérias aeróbias e anaeróbias

Os anaeróbios eram distribuidos prèviamente em toda a superfície das placas; em seguida, os aeróbios eram semeados com toque de alça, sôbre a superfície do meio, em círculo, próximo à periferia.

Uma vez semeados aeróbios e anaeróbios nas várias placas, eram as mesmas colocadas na jarra de Rodrigues, de onde se extraía o ar até a pressão atingir 400 mm. A jarra era colocada na estufa a 37°C por 24 horas, para que os aeróbios vegetassem. No dia seguinte extraia-se novamente ar do dessecador, de modo que a pressão atingisse 600 mm. e novamente a jarra era colocada na estufa por 24 horas, para que os anaeróbios completassem o seu desenvolvimento.

Antagonismo entre fungos (ou actinomicetos) e anaeróbios

Para estudarmos a ação antagonista de fungos e actinomicetos em relação aos anaeróbios, semeámos em estrias longitudinais, em placas de agar sangue, que eram incumbadas a 30°C durante 48 horas. Posteriormente, os anaeróbios eram semeados no mesmo meio, em estrias transversais, e as placas colocadas em anaerobiose, em jarra de Rodrigues, e incubadas a 37°C, 48 horas.

RESULTADOS

Na TABELA I estão descritos os resultados obtidos com a semeadura simultânea de *Bacillus* e *Clostridium*, com a finalidade de se verificar o antagonismo dos primeiros em relação aos segundos.

As principais espécies do gênero *Bacillus* capazes de impedir a vegetação dos anaeróbios foram: *B. cereus, B. subtilis, B. megatherium, B. mascerans, B. brevis, B. pumilus, B. licheniformis, B. circulans.* Outras espécies mostraram-se menos ativas, sendo algumas completamente inativas.

Na TABELA II, estão relacionados os resultados da ação antagônica de fungos e actinomicetos sôbre os anaeróbios.

DISCUSSÃO

Em trabalho anterior foi demonstrada a possibilidade de germes saprófitas do solo destruirem o *B. anthracis* nêsse substrato, uma vez que ficou demonstrado "in vitro" que êle era sensível a grande número daqueles microorganismos. A instalação dos "campos malditos" poderia depender, além de outros fatores, da flóra bacteriana do solo, onde ocorresse a morte de animais de carbúnculo.

O mesmo poder-se-ia dizer em relação ao *Cl. tetani* disseminado no solo pelas fezes de animais e aí implantados, desde que não fosse destruido pela flóra bacteriana coexistente. Os resultados por nós verificados "in vitro", demonstraram que o *Cl. tetani* é sensível a numerosos saprófitas encontrados frequentemente no solo, como: *B. cereus, B. megatherium, B. subtilis, B. brevis, B. pumilis, Penicillium notatum, Aspergillus luteus.*

Um fato que talvez venha confirmar essa hipótese relativamente ao *Cl. botulinum* é o de não ter sido o mesmo até agora isolado de amostras de solo no Brasil, ao passo que é frequente o seu isolamento em outros países, onde provoca intoxicações no homem e nos animais.

Dependeria essa ausência, da própria flóra microbiana do solo, ou seria devida a outros fatores, inclusive a pouca difusão dos conhecimentos do grupo dos *Clostridia* entre nós?

Verificamos no presente trabalho que o *Cl. botulinum* é inibido "in vitro" pelo: *B. cereus, B. subtilis, B. megatherium, B. mascerans, B. pumilus, B. circulans, P. notatum* e *Aspergillus luteus.*

Dentre os demais anaeróbios patogênicos, há os do grupo das gangrenas gazosas (*Clostridium septicum, Cl. perfringens,* etc.), que constituiram um sério problema na guerra de 1914, ocasionando, porém, atualmente, casos esporádicos de infeção no homem e nos animais. Tais germes são também sensíveis aos saprófitas do sólo, como está demonstrado na TABELA I.

O *Clostridium chauvoei,* encontrado em vastas regiões do Brasil, provoca grande mortalidade em bezerros. E' também sensível a grande número de saprófitas do solo: *B. cereus, B. megatherium, B. mascerans, B. brevis, B. pumilus, B. laterosporus, B. lentus.*

Deixamos aqui consignados nossos agradecimentos a J. Henriques, cujo auxilio técnico eficaz tornou possível a realização deste trabalho.

RESUMO

Estudamos nêste trabalho, a ação antagonista exercida por bactérias esporuladas aeróbias (*Bacillus*), fungos e actinomycetos sôbre bactérias anaeróbias (*Clostridium*).

Foi verificado que diferentes espécies do gênero *Bacillus* são capazes de inibir numerosos anaeróbios "in vitro". Como tais micro-organismos são encontrados comumente no solo, é possível que, em determinadas condições, exerçam ação destrutiva ou inibidora sôbre

os anaeróbios esporulados. A ocorrência de *Cl. tetani, Cl. botulinum, Cl. septicum, Cl. perfringens* e outros *Clostridia,* no solo, dependeria do equilíbrio entre a flóra microbiana saprófitica e as bactérias anaeróbias.

TABELA I

ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE BACILOS ESPORULADOS AERÓBIOS SÔBRE OS "*CLOSTRIDIA*" "IN VITRO"

AMOSTRAS DE AERÓBIOS ESPORULADOS EMPREGADAS	AMOSTRAS DE *CLOSTRIDIUM* ESTUDADAS							
	Clostridium septicum A3	Clostridium perfringens AK3	Clostridium botulinum A15	Clostridium tetani AE	Clostridium chauvoei A43	Clostridium putrificus tenuis AA	Clostridium sporogenes A43	Clostridium novyi 60
B. cereus n.º 5	I	O	I	I	I	I	I	I
B. cereus n.º 55	I	O	I	I	I	I	I	I
B. mycoides n.º 60	O	O	O	O	O	O	O	O
B. subtilis n.º 155	I	I	I	I	O	I	I	I
B. megatherium n.º 67 ...	I	I	I	O	I	I	I	I
B. megatherium n.º 129 ..	I	I	I	I	O	I	I	I
B. sphaericus n.º 74	O	O	O	O	O	I	O	O
B. sphaericus n.º 76	O	O	O	O	O	I	O	O
B. mascerans n.º 85	I	O	O	O	O	I	O	O
B. mascerans n.º 133	I	O	I	O	I	I	I	I
B. brevis n.º 87	O	I	O	I	I	I	I	I
B. brevis n.º 128	I	I	O	O	O	I	O	I
B. brevis n.º 159	O	O	O	O	I	O	O	O
B. pumilus n.º 88	I	I	I	O	I	I	O	I
B. pumilus n.º 134	O	I	O	I	O	I	O	I
B. laterosporus n.º 90 ...	I	I	O	O	I	I	O	I
B. laterosporus n.º 158 ..	O	O	O	O	I	O	O	O
B. lentus n.º 92	I	I	O	I	I	O	O	O
B. licheniformis n.º 93 ..	I	I	O	I	I	I	O	I
B. circulans n.º 94	O	O	O	O	O	O	O	O
B. circulans n.º 127	I	I	I	O	X	I	O	I
B. firmus n.º 95	I	I	O	O	X	I	O	I
B. polymyxa n.º 152	O	O	O	O	O	O	O	O
B. coagulans n.º 98	I	O	O	O	O	O	O	O
B. alvei n.º 99	O	O	O	O	X	I	O	O
B. alvei n.º 156	I	I	I	I	X	O	O	O
B. Anthracis n.º 114	I	O	O	O	X	I	O	O
B. subtilis n.º 178	I	I	I	I	O	I	I	I

I = inibe
O = não inibe
X = não estudado.

TABELA II

AÇÃO ANTAGÔNICA DE FUNGOS E ACTINOMICETOS SÔBRE *CLOSTRIDIA* "IN VITRO"

	Clostridium septicum A8	Clostridium perfringens AT8	Clostridium botulinum A15	Clostridium tetani AE	Clostridium putrificus AA	Clostridium novyi 60
Penicillium notatum	I	I	I	I	I	I
Aspergillus luteus	O	I	I	I	O	O
Aspergillus niger	O	O	O	O	O	O
Streptomyces sp.	O	O	O	O	O	O

I = inibe
O = não inibe.

ANTAGONISTIC ACTION OF SAPROPHYTIC MICROORGANIMS FROM THE SOIL ON ANAEROBIC BACTERIA (*CLOSTRIDIA*)

Abstract

In this paper the antagonistic action of aerobic sporulated bacteria (Bacillus), Fungi and Actinomycetes on anaerobic sporulated bacteria (Clostridium) was investigated

It could be verified that numerous species of Bacillus inhibit the growth of anaerobic bacteria "in vitro".

All these microorganisms live in the soil and the possibility of a interaction among them is highly suggestive. The occurrence of Cl. tetani, Cl. botulinum, Cl. septicum, Cl. perfringens and other Clostridia in the soil is probably related to an equilibrium between the anaerobic bacteria and the saprophytic microbial flora in the same environment.

BIBLIOGRAFIA

1) NICOLAÏER, A. 1886. Beiträge zur Aetiologie des Wundstarrkrampfen. Inag. Diss., Göttingen (1885). Citado por Waksman, "Microbiological Antagonisms and Antibiotic Substances". *The Commonwealth Fund*, New York, 1945.

2) NICOLAÏER, A. 1884. Ueber infectiösen Tetanus. *Deutsche med. Wchnschr.*, **10**: 842-844.

3) Meyer, K. F., and Dubovsky, B. J. 1923. The distribuition of the spores of *B. botulinus* in California. *J. Infect. Dis.*, 31: 41-55, 56-58,59.

4) Kayukova, N. I., and Kramer, T. A. 1945. Development and toxin formation of *Bacillus botulinus* in mixed cultures. Citado por Waksman, "Microbiological Antagonisms and Antibiotic Substances". *The Commonwealth Fund*, New York, 1945.

5) Passini, F. 1926. Ueber die Lebensdauer der Tuberkulbazillen in Kulturen anaerober. Fäulnissbakterien. *Wien. Klin. Wchenschr.*, 38: 1182-1184.

6) Quortrup, E. R. and Holt, A. L. 1941. Detection of potencial botulinus toxin producing areas in western duck marshes with suggestions for control. *J. Bact.*, 41:303-372.

7) Hall, I. C. and Peteron, E. 1923. The effect of certain bacteria upon the toxin prodution of *Bacillus botulinus* in vitro. *J. Bact.*, 8: 319-341.

8) Jordone, E. O. and Dack, G. M. 1924. The effect of *Cl. sporogenes* on *Cl. botulinum*. *J. Infect. Dis.*, 35: 576-580.

9) Dack, G. M. 1926. Influence of anaerobic species on toxin of *Cl. botulinum* with special reference to *Cl. sporogenes*. *J. Infect. Dis.*, 38: 165-173.

10) Rodrigues, C. e Guida, V. O. 1945. Toxigênese tetânica em culturas associadas. *Arquivos do Inst. Biológico*, 16: 193-216.

11) Guida, V. O. e Rodrigues, C. 1946. Sôbre a influência do *Clostridium sporogenes* na toxigênese tetânica. *Arquivos do Inst. Biológico*, 17: 73-97.

12) Guida, V. O. 1955. Antagonismo in vitro de microorganismos saprófitas do solo (bactérias, fungos e actinomicetos) sôbre o *B. anthracis*. *Arquivos do Inst. Biológico*, 22: 50-55.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS: 9, 10 e 11.

ESTAMPA 9

ANTAGONISMO ENTRE *BACILLI* E *CLOSTRIDIA*.

Semeadura em toda a extensão da placa:

Fig. 1: *Clostridium putrificum*
Fig. 2: *Clostridium tetani*
Fig. 3: *Clostridium botulinum*
Fig. 4: *Clostridium septicum*

A — Semeadura com toque de alça, em circulo, da esquerda para a direita: *Bacillus cereus* n.º 5 e n.º 55 — *B. mycoide* n.º 60 — *B. subtilis* n.º 155 — *B. megatherium* n.º 67 — *B. sphaericus* n.º 74 — *B. brevis* n.º 87 — *B. pumilus* n.º 88 — *B. laterosporus* n.º 90.

B — Semeadura com toque de alça, em círculo, da esquerda para a direita: *Bacillus cereus* n.º 5 e n.º 55 — *B. mycoide* n.º 60 — *B. sphaericus* n.º 74 — *B. subtilis* n.º 155 — *B. brevis* n.º 87 — *B. megatherium* n.º 67 — *B. pumilus* n.º 88 — *B. laterosporus* n.º 90.

ESTAMPA 10

ANTAGONISMO ENTRE *BACILLI* E *CLOSTRIDIA*.

Semeadura em toda a extensão da placa:

Fig. 1: *Clostridium septicum*
Fig. 2: *Clostridium perfringens*
Fig. 3: *Clostridium novyi*
Semeadura em circulo, com toque de alça, da esquerda para a direita: *Bacillus lentus* n.º 92 — *B. licheniformis* n.º 93 — *B. circulans* n.º 94 *B. coagulaus* n.º 98 — *B. mascerans* n.º 133 — *B. alvei* n.º 156 — *B. polymyxa* n.º 152 — *B. subtilis* n.º 178.

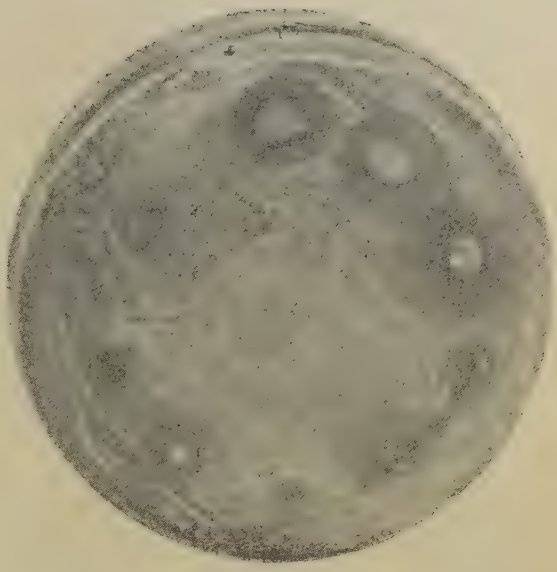
ESTAMPA 11

Fig. 1: Antagonismo entre *Penicillium notatum* e germes do gênero *Clostridia*.
Estria horizontal: Penicillium notatum.
Estrias verticais da esquerda para a direita: Cl. novyi, Cl. *septicum, Cl. perfringens, Cl. botulinum, Cl. putrificum* e *Cl. sporogenes* (figs. 1 e 2).

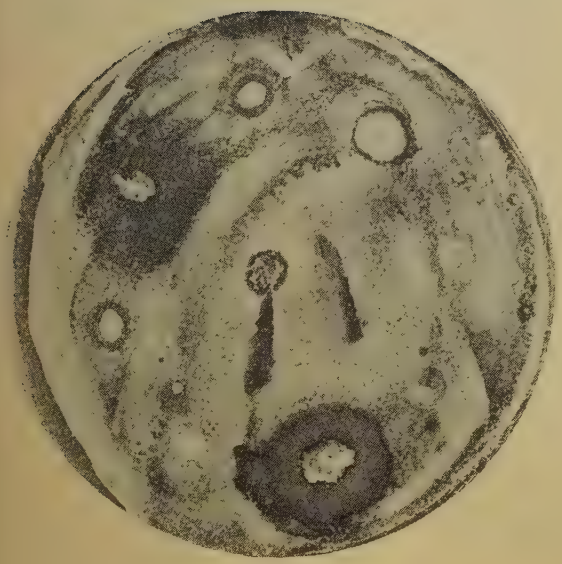
Fig. 2: Antagonismo entre *Streptomyces* sp. e germens do genêro *Clostridium*. Estria horizontal: Streptomyces sp.
Estrias verticais da esquerda para a direita: Cl. novyi, Cl. septicum, *Cl. perfringens, Cl. botulinum, Cl. putrificum* e *Cl. sporogenes*. (Figs. 1 e 2).

1

A

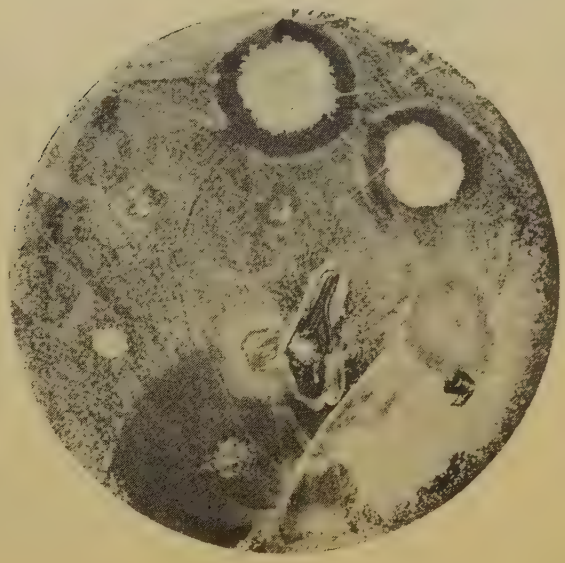


2

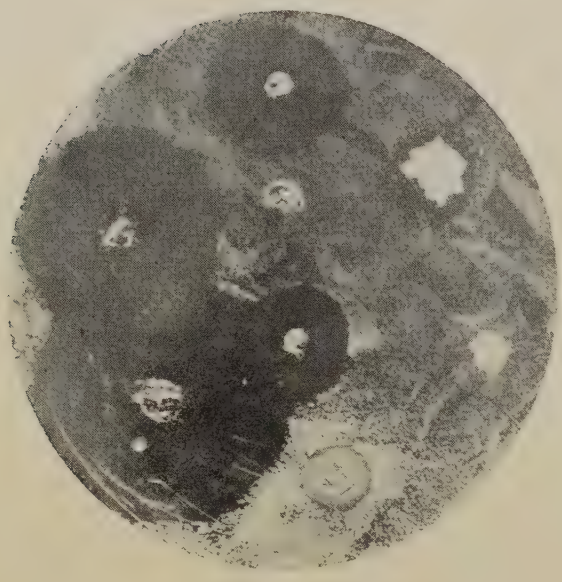


3

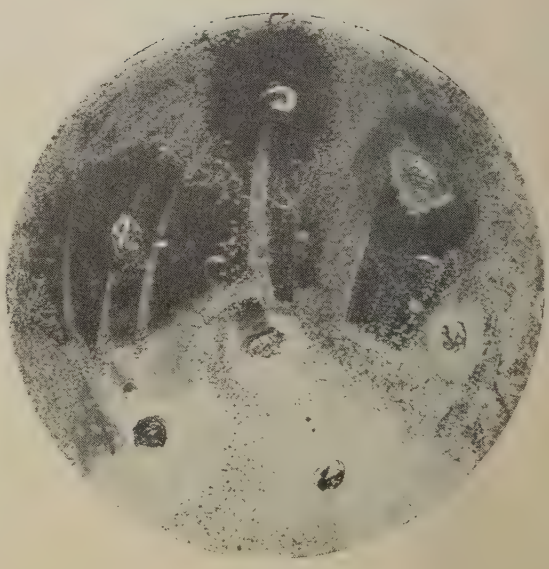
B



4



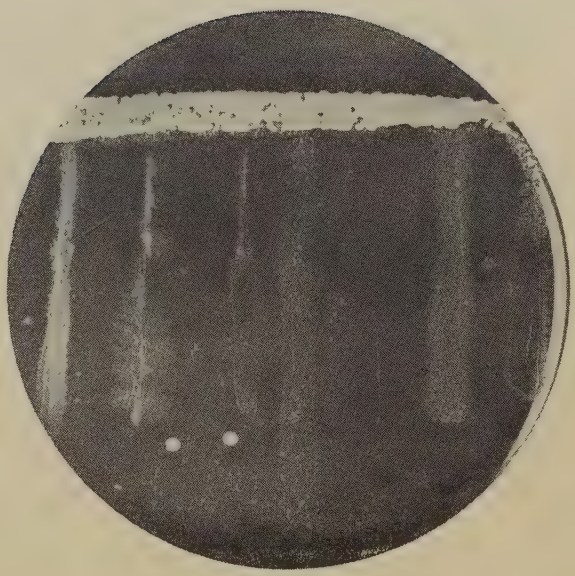
1



2

3

1



2

Vol. 22 — Artigo 9 Novembro de 1955

ESTUDOS SOBRE AS MIRIANGIALES
V. ELSINOACEAS DA COSTA DO MARFIM (AFRICA OCIDENTAL FRANCESA) (1)

POR

A. A. Bitancourt e Anna E. Jenkins (2)

Do Instituto Biológico de S. Paulo e do
United States International Cooperation Administration

Com as estampas 12 e 13

A excursão V-4 à Costa do Marfim (MANGENOT et al 1954) do VIIIº Congresso Internacional de Botânica, que se realizou em Paris em Julho de 1954 e no qual os autores tomaram parte (BITANCOURT & JENKINS 1954), proporcionou ao primeiro a oportunidade de coligir naquela possessão da Africa Ocidental Francesa especimens de plantas tropicais atacadas por fungos da familia das Elsinoaceas, causadores das doenças conhecidas genéricamente por antracnoses maculadas (JENKINS 1947). O fim principal de sua participação à excursão era fazer observações sôbre as doenças do cafeeiro e este assunto já foi objeto de uma publicação (BITANCOURT 1954). Nela se encontra um mapa da Costa do Marfim onde figura o itinerário da excursão, e muitas das localidades onde foram colhidos os especimens que fazem o objeto do presente trabalho.

A Costa do Marfim, situada entre os graus de latitude norte 5º e 10º, é uma região de clima equatorial, em geral quente e úmido, e acreditávamos que nela encontrariamos numerosos representantes desse grupo de doença. Pelo contrário, num intervalo de mais de um mês, sòmente podemos coligir pouco mais de uma dezena de especimens. E' notável a ausência de Elsinoaceas na floresta densa equatorial onde são também relativamente pouco comuns os outros Ascomicetos foliicolas, as Uredinales e as Ustilaginales, tão abundantes nos climas subtropicais comparativamente mais secos que o clima equatorial da Costa do Marfim. Ao contrário na floresta densa é extraordinária a quantidade de Basidiomicetos causadores de lesões generalizadas ou de manchas características das fôlhas do tipo das manchas areoladas ("target spots"). Temos constatado que tais tipos de manchas sòmente são encontrados nas partes mais úmidas das regiões tropicais como a baixada do litoral paulista e a floresta higrófila das encostas da serra do Mar no Estado de S. Paulo.

(1) Uma contribuição dentro do Programa de Assistência Técnica em operação no Brasil, sob a administração conjunta dos Governos do Brasil e dos Estados Unidos. Para os Estados Unidos o programa é administrado pelo International Cooperation Administration, através do Institute of Inter-American Affairs.

(2) Dr. Jenkins, Micologista, está destacada no Technical Assistance Program, no Brasil.

Apesar dessa fraca ocorrência de Elsinoaceas na Costa do Marfim, foi possível no decorrer da excursão colher um certo número de especimens com sintomas mais ou menos típicos das antracnoses maculadas. Estes especimens foram encontrados em geral nas regiões menos acentuadamente úmidas da Costa do Marfim. Três especimens são de plantas cultivadas e um de uma planta silvestre, atacadas por espécies já descritas do gênero *Elsinoë*. O exame microscópico em São Paulo revelou a presença da forma perfeita, ou seja de frutificação do tipo ascoma, em cinco outros especimens que são descritos no presente trabalho como novas espécies do gênero *Elsinoë*. Finalmente quatro especimens apresentam sintomas de antracnoses maculadas mas não encontramos, nas lesões, frutificações do agente causal que permitam a sua identificação.

Na descrição técnica das novas espécies as côres são indicadas aproximadamente em português. A indicação precisa é feita entre parênteses, em inglês, de acôrdo com RIDGWAY (RIDGWAY 1912).

Os especimens coligidos durante a excursão estão depositados no herbário da Secção de Fitopatologia do Instituto Biológico (IB). De acôrdo com o que foi feito no caso de publicações anteriores, parte de cada especimen, identificado quanto à espécie, foi depositada no "National Fungus Collections" (NFC) (3). Nos casos em que foi possível subdividir o especimen em número maior de porções, os especimens foram também depositados no herbário do Laboratoire de Cryptogamie, Museum d'Histoire Naturelle (MHN), Paris, França e no Commonwealth Mycological Institute (CMI), Kew, Surrey, Inglaterra. Três especimens serão incluidos na coleção: Jenkins-Bitancourt Myriangiales selecti exsiccati (MSE).

Sob o título "Especimens examinados" indicamos a distribuição nesses diversos herbários pelas iniciais acima indicadas. Os números correspondentes dos herbários são também indicados no caso de (IB) e (NFC).

Cumpre-nos apresentar aqui os nossos agradecimentos ao Professor G. MANGENOT, organizador da excursão do Congresso Internacional de Botânica à Costa do Marfim e ao seu colaborador Dr. J. MIÈGE, que identificaram os especimens de plantas silvestres, a Dom B. PICKEL que traduziu as diagnoses para o Latim, ao Dr. S. P. WILTSHIRE, Diretor do Commonwealth Mycological Institute que nos cedeu parte dos especimens de *Rhigiocarya racemifera* colhidos por Dr. F. C. DEIGHTON em Sierra Leone, aos diretores do Instituto Bra-

(3) Este é o novo nome das "Mycological Collections" para as quais, nas publicações anteriores, usamos o prefixo USM. Estas coleções acham-se no Plant Disease Epidemics and Identification Section (nova designação do Mycology and Disease Survey), Agricultural Research Service, U. S. Department of Agriculture, Beltsville, Maryland.

sileiro do Café e membros do Conselho do Fundo de Pesquisas do Instituto Biológico cujo auxilio permitiu ao primeiro autor a sua participação no Congresso Internacional de Botânica e à excursão à Costa do Marfim.

1. *Elsinoë baphiae* sp. nov.

Estampa 12, *A* - *D*

Manchas das fôlhas a principio pequenas, anfigenas, arredondadas, esparsas ou reunidas ao longo das nervuras secundárias ou das margens das fôlhas, que enrugam ou deformam ligeiramente, às vezes concrescentes em areas irregulares, de côr de tijolo (*brick red*), medindo 0,1 a 1,5 mm de diametro; mais tarde as manchas apresentam maior diâmetro, secam na parte central que fica reduzida a uma fina película clara, translucente, não raro perfurada, rodeada de uma margem saliente de côr marrom (*Vandyke brown*). Na face inferior das nervuras, nos pecíolos e nas hastes as manchas são maiores e alongadas.

Ascomas arredondados, os maiores levemente salientes, pulvinados, com a parte superior plana, às vezes confluentes, intraepidérmicos, rompendo a parede externa da epiderme de cujos restos dilacerados permanecem cobertos, revestidos de um epitécio de células isodiametricas escuras, de 7 a 12 μ de espessura, e feitos internamente de um pseudoparênquima hialino que na parte profunda se transforma paulatinamente em plectênquima, imiscuido entre as células externas do mesofilo do hospedeiro, medindo 100-200 x 48-80 μ. Ascos globosos, distribuidos numa só camada no pseudoparénquima, em contato uns com os outros ou separados por estreita trabécula de tecido pseudoparenquimatoso, com forte espessamento apical da parede interna, contendo até 8 ascosporos, medindo 17 a 21 μ de diametro; ascosporos hialinos, munidos de 3 septos, com célula media superior mais grossa que as demais, medindo 12-15 × 5,5-7 μ.

Maculis in foliis, amphigenis, rotundatis, sparsis aut congregatis secus nervos aut oram foliorum, testaceis dein in centrali parte albis et translucidis, frequenter perfuratis, cum margine elevato testaceo, 0,1-1,5 mm magnis.

Ascomatibus rotundatis, leviter elevatis, pulvinatis, intraepidermicalibus, erumpentibus, epithecio obscuro et centro hyalino pseudoparenchymatoso, 100-200 × 40-80 μ magnis, repleto ascis globosis 17-21 μ magnis, octosporis hyalinis, 3-septatis, 12-15 × 5,5-7 μ magnis.

Distribuição: causando uma antracnose maculada do "kambi", *Baphia nitida* Lodd. (Leguminosas) na Costa do Marfim.

Especimens examinados:

Jardim do Institut d'Enseignement et Recherches Tropicales, Adiopodoumé, 31 de Julho de 1954, A. A. Bitancourt 1073 (IB 6299, NFC 90754, MHN, MSE); Akandjé, Laguna de Aguien, perto de Bingerville, 23 de Agosto de 1954, A. A. Bitancourt 1091 (IB 6406, NFC 90755, MHN, CMI) Tipo.

Esta espécie tropical africana acrescenta o gênero *Baphia* às leguminosas em que estes fungos foram anteriormente assinalados.

2. *Elsinoë basellae* Bitanc. & Jenkins

Arq. Inst. Biol. 17: 47.1947 (Est. 1, A e B)

Sòmente foi vista uma cultura de bertalha (*Basella alba* L.) em tôda a excursão e de um modo geral as plantas mostravam-se sadias. Sòmente num pé foram encontradas uma fôlha e uma haste bem atacadas de verrugose. Esta doença da bertalha é causada por *E. basellae*, que foi descrita a partir de um especimen de Uganda, unico outro caso conhecido da doença.

Especimen examinado:

Estação Experimental da Quineira, perto de Man, Costa do Marfim, 13 de Agosto de 1954, A. A. Bitancourt 1084 (IB 6399 NFC 90756, MHN).

3. *Elsinoë crossopterygis* sp. nov.

Estampa 12, *E - H*

Manchas das fôlhas anfígenas porém mais visíveis na face superior da fôlha, esparsas ou mais frequentemente localizadas nos espaços entre as nervuras laterais e mais abundantes ao longo da margem da parte superior da fôlha onde se tornam confluentes, arredondadas, na face superior da fôlha pouco salientes, as maiores com centro de côr branca devido ao esvasiamento das células epidermicas do hospedeiro, com margem larga, de côr marrom muito escura ou quase preta (*blackish brown*), impregnadas de um pigmento avermelhado que se estende ao tecido são em torno das manchas; na face inferior das fôlhas menos bem definidas, consistindo tão sòmente num escurecimento mais ou menos acentuado do limbo, medindo 0,5 a 4 mm de diâmetro; na face superior das nervuras as manchas são alongadas, de forma navicular.

Ascomas intraepidermicos, rompendo a espessa parede externa das células epidermicas do hospedeiro que continua cobrindo em parte, feitos de um estroma pseudoparenquimatoso hialino, bem delimitados dos tecidos do hospedeiro, cobertos de um epitecio escuro, com 12 μ de espessura, repletos de ascos irregularmente distribuidos em todo o estroma, medindo 100-200 × 75 μ. Ascos globosos, com cerca de 16-20 μ de diâmetro, contendo até 8 ascosporos hialinos, munidos de 1 a 3 septos transversais, constritos no septo mediano, às vezes com um septo longitudinal em algumas de suas células medianas, medindo 12-14 × 6-7 μ.

Esporodoquios da forma imperfeita (*Sphaceloma*) intraepidermicos, rompendo as paredes externas da epiderme, assentados sôbre a parte superior das células do parênquima em paliçada, cheias de goma de ferida, da fôlha do hospedeiro, feitos de uma paliçada de conidióforos escuros, intimamente aderentes entre sí, às vezes abaulada, com células externas alongadas, de ápice atenuado, medindo 6 × 12 μ, sôbre uma base de plectênquima hialino, medindo 30-80 × 22-30 μ. Não foram vistas conidias.

Maculis in foliis amphigenis magis visibilibus in facie ventrali, saepe internerviis, rotundatis, maculis, minoribus castaneo-obscuris, nigrescentibus, maculis maioribus centro albis, margine lato castaneo cinctis, 0,5 — 4 mm.

Ascomatibus intraepidermicalibus, erumpentibus, pseudoparenchymatoso-hyalinis, epithecio obscuro tectis, ascis repletis, 100-200 × 75 μ magnis. Ascis globosis, 16-20 μ magnis, octosporis hyalinis, 1-3-septatis, medio constrictis, nonnumquam longitudinaliter 1-septatis, 12-14 × 6-7 μ magnis.

Sporodochiis formae imperfectae (Sphaceloma) intraepidermicalibus, erumpentibus, e conidiophoris obscuris in palum coadunatis, e plectenchymate hyalino enascentibus, 30-80 × 22-30 μ magnis. Conidiis non visis.

Distribuição: causando uma antracnose maculada da "bellenda", *Crossopteryx febrifuga* BENTH. (Rubiaceas) na Costa do Marfim.

Especimen examinado:

Savana culminante do Orumbo Boka, perto de Assakra, 20 de Agosto de 1954, A. A. BITANCOURT 1088 (IB 6403, NFC 90757, MHN, CMI, MSE) Tipo.

Esta espécie africana acrescenta o gênero *Crossopteryx* à lista de Rubiaceas hospedeiras de *Elsinoë*.

4. *Elsinoë ivorensis* sp. nov.

Estampa 13, *A*, *G* e *H*

Manchas epifilas ou hipofilas, salientes, visiveis na face oposta da fôlha como uma acentuada depressão, redondas ou elipticas, de contorno bem delimitado, às vezes por um sulco mais ou menos profundo, esparsas, com margem formada por uma nitida linha escura (*Chaetura drab*), centro plano, de superficie mais ou menos rugosa, de côr parda acinzentada (entre *vinaceous buff* e *olive buff*), possuindo nas manchas hipofilas uma forte depressão central formando um ponto escuro no centro da mancha, medindo 2 a 4 mm de diametro.

Ascomas constituidos por um estroma efuso, formando de espaço em espaço pequenos nódulos de tecido parenquimatoso hialino, entre as células repletas de goma de ferida e deformadas do tecido hipertrófico da superficie das lesões do hospedeiro; os nódulos estromáticos, que medem 25 a 60 μ de diâmetro estão repletos de ascos globosos, de 15 a 22 μ de diâmetro, contendo até 8 ascosporos hialinos, munidos de 1 a 3 septos transversais, medindo 12-16 × 6-7 μ.

Maculis sparsis, epi- vel hypophyllis, rotundatis, convexis, cinereis, linea nigra cinctis, centro puncto nigro signatis, 2-4 mm magnis. Ascomatibus cum stromate effuso e massis stromaticalibus confectis, repleto ascis octosporis, hyalinis, 1-3 septatis, 12-16 × 6-7 μ magnis.

Distribuição: causando uma verrugose de *Loranthus* sp. (Lorantaceas) na Costa do Marfim.

Especimen examinado:

Localidade não registrada, Costa do Marfim, Julho de 1954, A. A. BITANCOURT 1093 (IB 6408, NFC 90758, MHN) Tipo.

Esta é a primeira *Elsinoë* assinalada num representante da familia das Lorantaceas.

5. *Elsinoë mangiferae* Bitanc. & Jenkins

Arq. Inst. Biol. 17: 218. 1946 (Est. 12 a 14)

Este fungo que causa a verrugose da mangueira (*Mangifera indica* L.) sòmente foi encontrado em uma das localidades visitadas, embora esta árvore frutifera seja comum na Costa do Marfim. Também foi constatado em árvores cultivadas na base do IFAN (Institut Français de l'Afrique Noire) na Guiné Francesa. Em ambos os casos a doença era benigna, talvez porque ocorria em árvores adultas e não em viveiros onde costuma ser mais grave.

Especimens examinados:

Estação Experimental Florestal, Akokondekro, perto de Bouaké, Costa do Marfim, 19 de Agosto de 1954, A. A. Bitancourt 1086 (IB 6401, NFC 90759, MHN); Base do IFAN, perto de Nzo, Guiné Francesa, 12 de Agosto de 1954, A. A. Bitancourt 1083 (IB 6398, NFC 90760, MHN).

E' esta a primeira vez que se assinala a verrugose da mangueira fora das regiões neotropicais.

6. *Elsinoë mulleri* Bitanc. & Jenkins

Arq. Inst. Biol. 20: 17. 1950 (Est. 4, *O* - *Q*)

Este fungo causa a antracnose maculada de *Polyscias guilfoylei* (Bull.) L. H. Bailey. Na Costa do Marfim como no sul do Brasil, esta Araliacea é usada na formação de cercas vivas. A descoberta desta doença numa das localidades da excursão estende à Africa Ocidental a sua distribuição geográfica, anteriormente limitada à Venezuela e ao Brasil (Bitancourt e Jenkins 1950).

Especimen examinado:

Aldeia de Azaguié, perto da Floresta de Yapó, Costa do Marfim, 30 de Julho de 1954, A. A. Bitancourt 1071 (IB 6297, NFC 90761, MHN).

7. *Elsinoë rhigiocaryae* sp. nov.

Estampa 13, *B* - *D*

Manchas grandes, esparsas, epifilas ou hipofilas, predominando um ou outro desses tipos numa mesma fôlha, fortemente salientes, visíveis na face oposta da folha como uma acentuada depressão de cor escura, bem delimitadas dos tecidos sãos em volta por meio de um sulco mais ou menos acentuado, de superficie rugosa ou coberta de finas papilas salientes com 0,1 mm de diâmetro, de côr marrom avermelhada escura (*burnt umber*), medindo 2 a 5 mm de diâmetro.

Ascomas constituidos por um estroma de pseudoparênquima hialino que cobre uniformemente a superficie dos tecidos hiperplásticos das lesões numa espessura de

cerca de 25 μ, com células superficiais mais escuras formando um epitecio, ou alojados nas anfractuosidades entre as papilas, contendo ascos irregularmente distribuidos na massa estromática, globosos, com 22-28 μ de diâmetro, que contêm até 8 ascosporos hialinos, munidos de 3 septos transversais ou ligeiramente obliquos, raramente com um septo longitudinal em uma de suas células, constritos no septo mediano, medindo 12-16 × 5-7 μ.

Maculis sparsis, epi- vel hypophyllis, valde convexis, latere altero concavis, bene limitatis, a mesophyllo sano distinctis, superficie rugulosa, castaneo-vinaceis, 2-5 mm magnis.

Ascomate e stromate pseudoparenchymatoso hyalino confecto maculas uniformiter tegente, epithecio obscuro cooperto, vel e singulis massis stromaticalibus constituto, ascis globosis, 22-28 μ magnis, ascosporis hyalinis, 3-septatis, raro longitudinaliter septatis, medio constrictis, 12-16 × 5-7 μ magnis.

Distribuição: causando uma verrugose de *Rhigiocarya racemifera* Miers e *Rhigiocarya peltata* Miège (Menispermaceas) na Costa do Marfim e Sierra Leone.

Especimens examinados:

Sôbre *Rhigiocarya racemifera,* floresta do Institut d'Enseignement et Recherches Tropicales, Adiopodoumé, Costa do Marfim, 28 de Julho de 1954, A. A. Bitancourt 1062 (IB 6288, NFC 90762, MHN, CMI), Tipo; Bomaru, Sierra Leone, 18 de Outubro de 1939, F. C. Deighton 2115, ex- (CMI) (IB 4870, NFC 73634); Joru, Sierra Leone, 19 de Janeiro de 1940, F. C. Deighton 2200, ex- (CMI), (IB 4030, NFC 73633); sôbre *Rhigiocarya peltata* Miège (4) perto de Lakota, Costa do Marfim, 1 de Agosto de 1954, A. A. Bitancourt 1078 (IB 6393, NFC 90763, MHN).

A única outra espécie de *Elsinoë* descrita num representante da familia das Menispermaceas é *E. menispermacearum,* sôbre *Tinospora* spp. Esta é uma das quatro espécies de Java descritas por Raciborski no trabalho onde êle descreve o gênero *Elsinoë* (Raciborski 1900).

8. *Elsinoë salaciae* sp. nov.

Estampa 13, *E, F* e *I*

Manchas ou pústulas das hastes arredondadas quando pequenas, irregulares no caso contrário, fortemente salientes, bem delimitadas dos tecidos sãos por um sulco periférico, apresentando uma série de finas rugas sinuosas, superpostas, concentricas, geralmente fendidas longitudinalmente, que envolvem a parte central, fortemente deprimida nas manchas grandes, de superficie irregular e fendilhada, medindo 0,8 × 4 mm de diâmetro, muitas vezes concrescentes em cancros irregulares, salientes e mais ou menos extensos.

(4) Esta nova especie de *Rhigiocarya* está descrita no ultimo fasciculo do Bulletin de l'Institut Français d'Afrique Noire, atualmente no prélo.

Ascomas superficiais, pulvinados, feitos de um pseudoparênquima escuro na parte externa, hialino na parte interna, medindo 100 × 50 μ, contendo uma ou duas camadas de ascos na parte periferica; ascos globosos ou ovalados, com cerca de 22 μ de diâmetro, contendo até 8 ascosporos hialinos, munidos de 3 septos transversais, às vezes com um septo longitudinal em uma ou outra das células medianas, medindo 12-14 × 6-7 μ.

Pustulis ramulorum rotundatis, pusillis vel irregularibus magnis, valde eminentibus, bene limitatis, margine fine-rugulosis, parte centrali concavis, superficie irregulari 0,8 × 4 mm magnis per coalescentiam pustulorum protuberantiam cancerosam magis vel minus extensam formantibus.

Ascomatibus superficialibus, pulvinatis, e pseudoparenchymate extus obscuro, intus hyalino, formatis, 100 × 50 μ magnis, unam vel duas series ascorum includentibus. Ascis globosis vel ovatis 22 μ magnis, octosporis hyalinis, 3-septatis, raro longitudinaliter septatis, 12-14 × 6-7 μ magnis.

Distribuição: causando uma verrugose de *Salacia* sp. (Hipocrateaceas) na Costa do Marfim.

Especimen examinado:

Floresta do Banco, Abidjan, 29 de Julho de 1954, A. A. Bitancourt 1069 (IB 6295, NFC 70764, MHN, CMI, MSE), Tipo.

As lesões produzidas por este fungo são notavelmente salientes, um carater que as torna particularmente conspicuas nas hastes mais finas.

Esta é a primeira *Elsinoë* assinalada num representante da familia das Hipocrateaceas.

9. *Elsinoë sidae* Bitanc. & Jenkins

Arq. Inst. Biol. 17: 51. 1946 (Est. 1, K e L).

Atribuimos tentativamente a este fungo a antracnose maculada que observamos em algumas fôlhas da planta silvestre *Sida acuta* Burm. f. (*S. carpinifolia* L. f.) embora os sintomas sejam um pouco diferente dos que se observam no especimen tipo, sôbre *S. cordifolia* L., de Uganda, unico que do nosso conhecimento foi assinalado anteriormente.

Especimen examinado:

Beira da Estrada de Guiglo a Tai, Costa do Marfim, 4 de Agosto de 1954, A. A. Bitancourt 1079 (IB 6394, NFC 90765).

Antracnoses maculadas de causa indeterminada.

Além dos especimens que acabam de ser descritos, foi colhido durante a excursão à Costa do Marfim um certo número de exemplares de plantas que apresentam lesões do tipo das antracnoses maculadas. As lesões, entretanto, não apresentam frutificações que

permitam a identificação do fungo causador provavel dessas antracnoses e que na maioria dos casos deve pertencer às Elsinoaceas. Em cada caso, tratar-se-ia de um novo hospedeiro de uma antracnose maculada, pelo que damos a seguir uma relação desses especimens com uma breve descrição dos sintomas que apresentam:

Bixa orellana L. (Bixaceas), Jardim do Institut d'Enseignement et Recherches Tropicales, Adiopodoumé, Costa do Marfim, 28 de Julho de 1954, A. A. BITANCOURT 1060 (IB 6286). Manchas hipofilas, principalmente localizadas nas nervuras secundárias e terciárias que tornam salientes.

Cercestis afzelii SCHOTT. (Araceas), Floresta do Banco, Abidjan, Costa do Marfim, 29 de Julho de 1954, A. A. BITANCOURT 1066 (IB 6292). Manchas principalmente hipofilas, formando pequenas pústulas hemisféricas de tecido corticoso. Possivelmente são intumescências de origem fisiológica.

Ficus exasperata VAHL. (Moraceas), Floresta do Institut d'Enseignement et Recherches Tropicales, Adiopodoumé, Costa do Marfim, 28 de Julho de 1954, A. A. BITANCOURT 1063 (IB 6289). Manchas típicas de antracnose maculada, pequenas, esparsas, com centro branco, reduzido a uma película translucente, frequentemente perfurada, e margem saliente de côr marrom.

Parinarium kerstingii ENGL. (Rosaceas), Floresta do Banco, Abidjan, Costa do Marfim, 29 de Julho de 1954, A. A. BITANCOURT 1067 (IB 6293). Manchas pequenas, arredondadas, de côr marrom avermelhada, as maiores com centro mais claro e margem escura.

O presente trabalho descreve cinco novas espécies de *Elsinoë*, acrescentando 5 novos gêneros e duas novas familias de hospedeiros — as Hipocrateaceas e as Lorantaceas, — ao número anteriormente conhecido desses gêneros e familias. *E. rhigiocaryae* sôbre *Rhigiocarya*, também representada por especimens colhidos há vários anos em Sierra Leone, é a segunda espécie de *Elsinoë* assinalada sôbre Menispermaceas. A distribuição geográfica de várias espécies anteriormente descritas acha-se estendida à Africa Ocidental no presente trabalho. E' este o caso de *E. basellae* e *E. sidae* de Uganda. A última, originalmente descrita em *Sida cordifolia*, foi agora encontrada em *S. acuta*. Da mesma forma *E. mangiferae* e *E. mulleri* anteriormente assinaladas sòmente no Hemisferio Ocidental, o são agora na Costa do Marfim. Em conjunto a coleção de Elsinoaceas feita durante a excursão à Costa do Marfim é a primeira desse grupo de fungos naquela parte da Africa Ocidental Francesa.

ÉTUDES SUR LES MYRIANGIALES V. ELSINOACÉES DE LA CÔTE D'IVOIRE (A. O. F.)

Résumé

L'excursion V-4 du VIIIe Congrès International de Botanique a fourni à l'un de nous l'occasion de récolter en Côte d'Ivoire des spécimens de plantes présentant les symptômes des anthracnoses maculées, c'est à dire de maladies qui sont généralement causées par des champignons ascomycètes de la famille des Elsinoacées. Parmi les 13 spécimens présentant ces symptômes 4 sont d'espèces déjà décrites: Elsinoë basellae qui produit la gale de Basella alba; E. mangiferae, cause de la gale du manguier (Mangifera indica); E. mulleri, cause de l'anthracnose maculée de Polyscias guilfoylei, un arbuste employé en Côte d'Ivoire comme au Brésil pour former des haies vives, et E. sidae, sur Sida acuta (S. carpinifolia). Cinq spécimens portent les fructifications (ascomes) d'Elsinoë et sont décrits comme espèces nouvelles de ce genre. Ce sont: E. baphiae, qui produit une anthracnose maculée de Baphia nitida; E. crossopterygis, cause d'une anthracnose maculée de Crossopteryx febrifuga; E. ivorensis, agent d'une gale de Loranthus sp. (Loranthacées); E. rhigiocaryae, qui produit une gale de Rhigiocarya racemifera et de Rhigiocarya peltata et E. salaciae, cause d'une gale de Salacia sp. (Hippocrateacées). Des symptômes d'anthracnoses maculées ou ressemblant à ceux de ces maladies s'observent sur les autres spécimens, mais l'absence de fructifications du champignon qui les cause en empêche l'identification. Ce sont Bixa orellana, Ficus exasperata, Cercestis afzelii et Parinarium kerstingii.

Les nouvelles espèces ajoutent 5 nouveaux genres et deux nouvelles familles, — mentionnées ci-dessus, — à la liste des hôtes d'Elsinoacées. E. rhigiocaryae, sur Rhigiocarya, qui est également représenté sur des spécimens cueillis il y a plusieurs années en Sierra Leone, est la deuxième Elsinoë signalée sur Ménispermacée. La distribution géographique de plusieurs espèces déjà décrites dans d'autres régions se trouve maintenant étendue à l'Afrique Occidentale. C'est le cas d'E. basellae et E. sidae d'Uganda, cette dernière, originellement décrite sur Sida cordifolia, étant ici signalée sur S. acuta. De même, E. mangiferae et E. mulleri jusqu'à présent connues seulement dans l'Hemisphère Occidental, sont ici signalées en Côte d'Ivoire.

Dans l'ensemble la collection d'Elsinoacées faite pendant l'excursion en Côte d'Ivoire est la première de ce groupe de champignons, pour ce territoire de l'Afrique Occidentale Française.

BIBLIOGRAFIA

BITANCOURT, A. A. — 1954 — As doenças do cafeeiro na Costa do Marfim (Africa Ocidental Francesa). *O Biológico* 20: 205-222.

BITANCOURT, A. A. & JENKINS, A. E. — 1946 — A verrugose da mangueira. *Arq. Inst. Biol.* S. Paulo 17: 205-228.

BITANCOURT, A. A. & JENKINS, A. E. — 1950 — Estudos sôbre as Miriangiales II. Vinte novas espécies de Elsinoaceas néotropicais. *Arq. Inst. Biol.* S. Paulo 20: 1-28.

BITANCOURT, A. A. & JENKINS, A. E. — 1954 — Spot anthracnoses (Resumo). *In* Rapports et communications parvenus avant le Congrès aux sections 18, 19 et 20. Cong. Internat. de Bot. 8.º, Paris 1954: 163-164.

JENKINS, A. E. — 1947 — A specific term for diseases caused by *Elsinoe* and *Sphaceloma*. *Plant. Dis. Reptr.* 31: 71.

JENKINS, A. E. & BITANCOURT, A. A. — 1946 — Observações sôbre espécies do gênero "Elsinoe" de Uganda. *Arq. Inst. Biol.* S. Paulo 17: 47-54.

MANGENOT, G., MIÈGE, J., & SCHNELL, R. — 1954 — V-4 Côte d'Ivoire-Guinée. *In* Notices botaniques et itinéraires commentés, 81 pp. Cong. Internat. de Bot. 8.º.

RACIBORSKI, M. — 1900 — Parasitischen Algen und Pilze Javas. t. 1, 39 pp. Batavia.

RIDGWAY, R. — 1912 — Color standards and color nomenclature. 43 pp. ilus. Washington, D. C.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 12

Figs. *A-D* — *Elsinoë baphiae* sôbre *Baphia nitida*. *A*, lesões sôbre a face superior de uma fôlha nova; *B*, lesões sôbre a face inferior de uma fôlha idosa, × 5; *C* e *D*, ascomas, × 500. Especimen tipo.

Figs. *E-H* — *Elsinoë crossopterygis* sôbre *Crossopteryx febrifuga*. *E*. lesões sôbre a face superior de uma fôlha, × 5; *F*, acérvulo, × 500; *G*, ascos e ascosporos, × 500; *H*, ascoma, × 500. Especimen tipo.

Fot. Bitancourt & Rodrigues

Estampa 13

Fig. *A* — *Elsinoë ivorensis*, lesões sôbre a face inferior de uma fôlha de *Loranthus* sp., × 5. Especimen tipo.

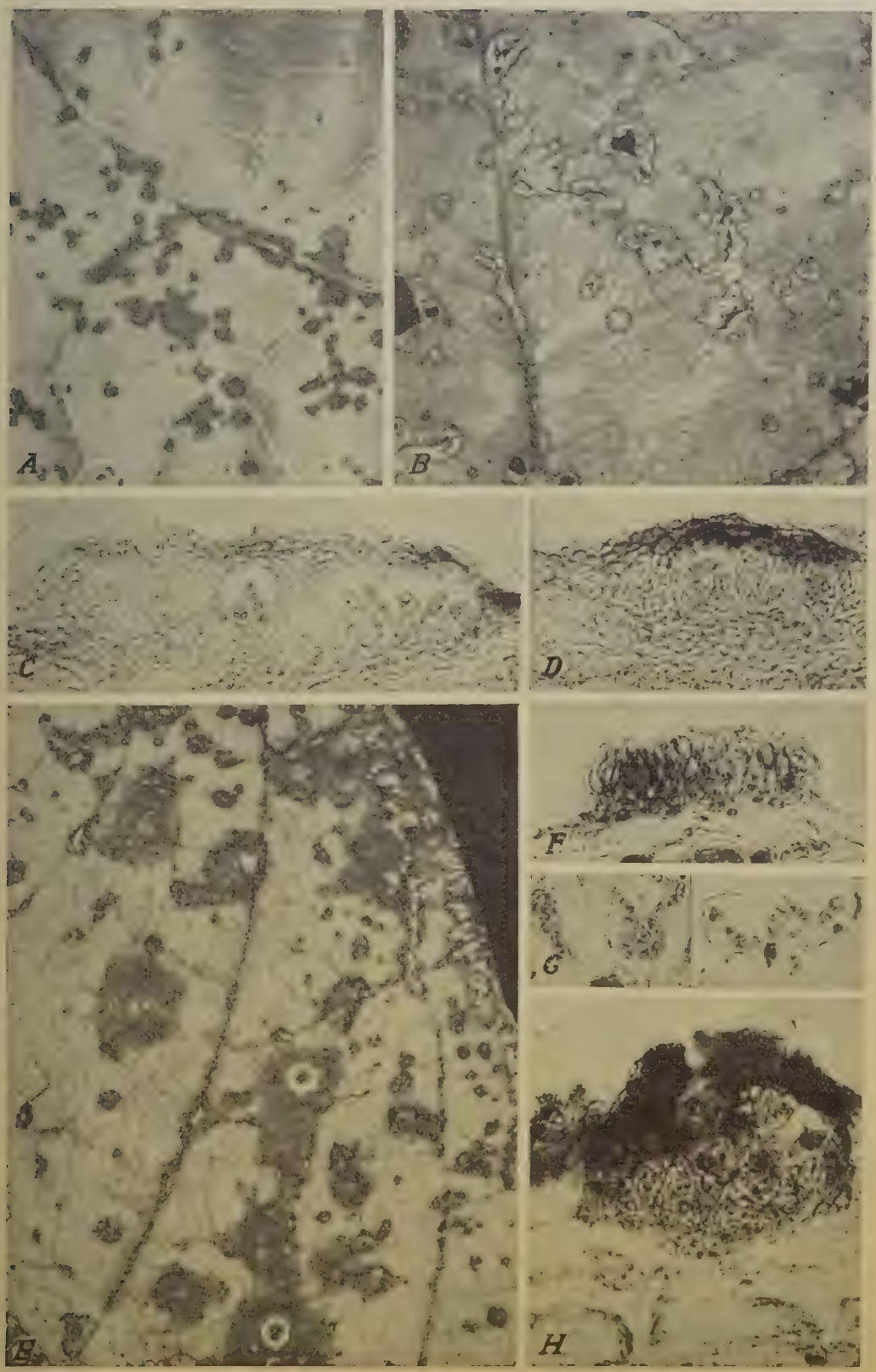
Figs. *B-D* — *Elsinoë rhigiocaryae* sôbre *Rhigiocarya racemifera*. *B*, lesões sôbre a face superior de uma fôlha, × 5; *C*, ascoma, × 500; *D*, pequeno ascoma contendo um asco de parede espessa e clara e repleto de ascosporos, × 500. Especimen tipo.

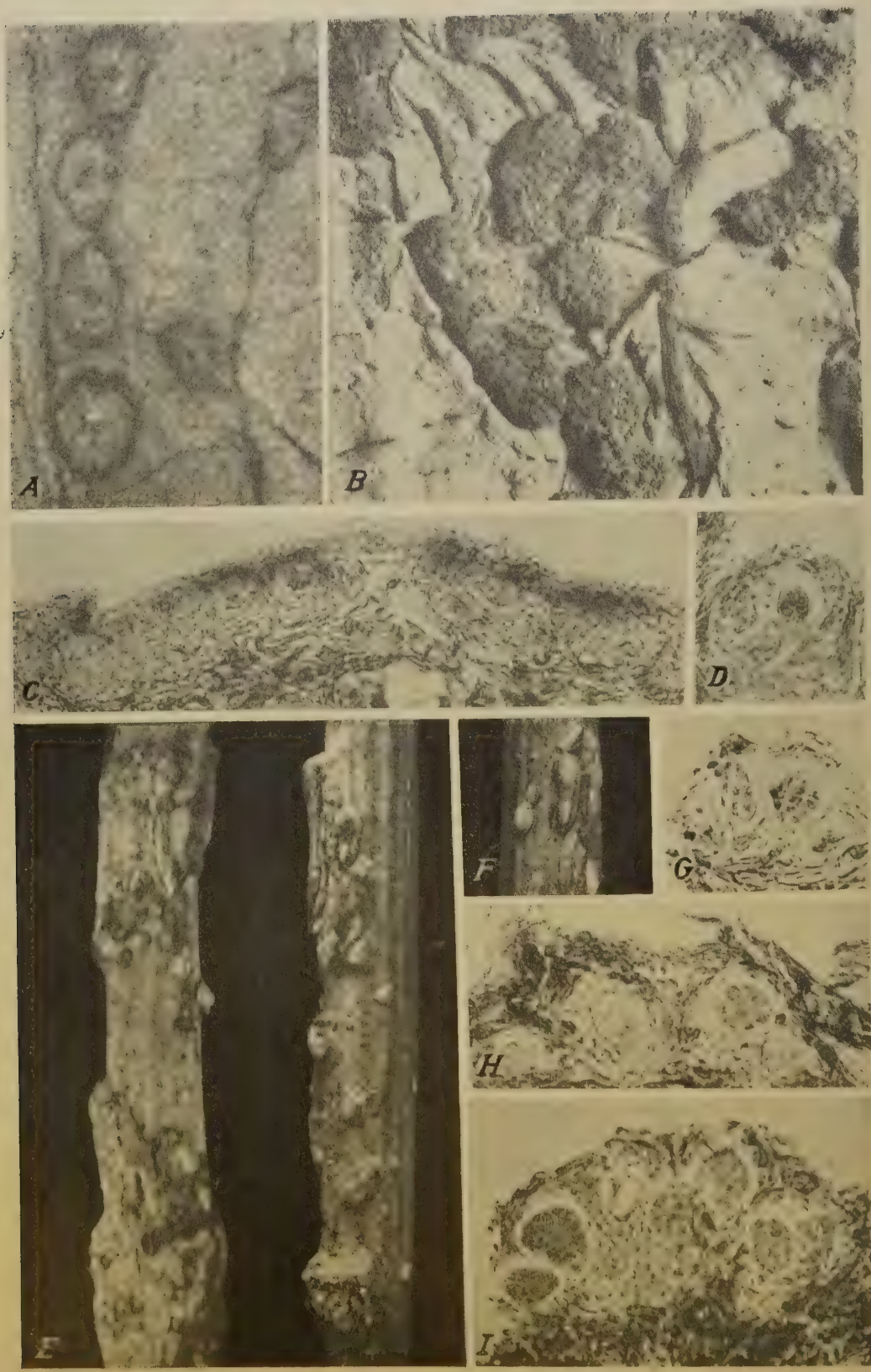
Figs. *E-F* — *Elsinoë salaciae* sôbre *Salacia* sp. mostrando galhos cobertos de lesões, × 5. Especimen tipo.

Figs. *G-H* — *Elsinoë ivorensis*, ascomas, × 500.

Fig. *I* — *Elsinoë salaciae*, ascoma, × 500.

Fot. Bitancourt & Rodrigues


A
B
C
D
E
F
G
H


A
B
C
D
E
F
G
H
I

Vol. 22 — Artigo 10 Novembro de 1955

ESTUDOS SÔBRE AS MIRIANGIALES
VI. VERRUGOSE DO MAMOEIRO, CAUSADA POR SPHACELOMA (1)

POR

G. B. Wallace, Anna E. Jenkins e A. A. Bitancourt

Do Department of Agriculture, Tanganyika (2)
United States International Cooperation Administration (3)
e Instituto Biológico de São Paulo

Com as estampas 14 e 15

O presente trabalho trata de uma nova doença do mamoeiro (*Carica papaya* L.) que designamos por "verrugose do mamoeiro". Em lingua inglesa a doença é chamada *papaw scab* ou *papaya scab*. Em Tanganyika o mamoeiro é conhecido sob o nome de *papaw* (GREENWAY, WALLACE e KHOMO 1953). Uma comunicação previa sôbre esta doença foi feita em 1953 (JENKINS, WALLACE e BITANCOURT 1953). (4)

DESCOBERTA DA DOENÇA

A "verrugose do mamoeiro", conforme designamos esta doença, é conhecida sòmente de uma unica manifestação de gravidade moderada, numa plantação de mamoeiros de 6 meses de idade em Tanganyika, Africa Oriental. Esta plantação pertence a uma propriedade perto de Moshi, na planicie ao pé do Kilimanjaro (Lat. 3° 5' S., aprox. Elevação 975 m, aprox.). A doença foi observada em Junho de 1953, isto é no fim da estação das chuvas, e desapareceu gradativamente com o inicio da estação seca. Esta última foi caracterizada por um período particularmente seco durante o resto do ano. A incidência da doença parece, pois, estar intimamente relacionada com a umidade. A origem da verrugose nessa plantação é desconhecida. O campo tinha sido semeado com sementes de produção local e não houve introdução de qualquer mamoeiro de outra proveniência.

Para melhorar a aeração da plantação, o mato, que se tinha desenvolvido abundantemente no inicio de 1953, foi capinado. Em 1954 as chuvas de Abril e Maio foram abaixo do normal e os meses seguintes foram excepcionalmente secos. A verrugose não tornou a se manifestar e não foi constatada em outras plantações.

---

(1) Uma contribuição dentro do Programa de Assistência Técnica em operação no Brasil, sob a administração conjunta dos Governos do Brasil e dos Estados Unidos. Para os Estados Unidos o programa é administrado pelo International Cooperation Administration, através do Institute of Inter-American Affairs.

(2) Dr. Wallace era, então, Fitopatologista, nesse Departamento.

(3) Dr. Jenkins, Micologista (ICA) está destacada no Technical Assistance Program, no Brasil.

(4) Este abstrato foi reproduzido em outra publicação (Anônimo 1954).

SINTOMAS

A observação dos sintomas da doença limitou-se, forçosamente, aos pés de mamoeiro de 6 meses de idade da plantação. As fôlhas doentes apresentam no inicio manchas amarelas ou verde pálidas. As fôlhas e as hastes podem ficar deformadas; as hastes podem engrossar e se desfolhar. Manchas verrugosas, iniciadas nos tecidos novos e tenros, podem ser poucas e esparsas ou ao contrario, mais ou menos abundantes.

Nas fôlhas elas se mostram em qualquer das faces, embora mais comuns na face superior, e podem estar espalhadas em toda a superfície do limbo ou, como é frequente, achar-se concentradas por cima, ou ao longo, das nervuras. As lesões que não se acham limitadas pelas nervuras são circulares ou ligeiramente irregulares, salientes, com margem distinta. São esbranquiçadas, com superfície um tanto áspera, com 0,2 a 1,0 mm. de diâmetro. Na face oposta da fôlha as manchas podem ser vistas como areas deprimidas, descoloridas. Na convergência das nervuras principais ou em outras partes da fôlha, as lesões podem se tornar coalescentes em areas irregulares, verrugosas. As partes gravemente afetadas do limbo folhar podem morrer. Nos peciolos e nas hastes as manchas são frequentemente alongadas; como nas fôlhas elas podem coalescer em areas grandes, verrugosas, de côr esbranquiçada. (Est. 14, A e B e Est. 15, A).

O PATÓGENO

O revestimento felpudo de côr parda olivacea (*olive buff*)[5] visível na superfície de algumas lesões é constituido pelas frutificações conidianas do patógeno, que pertence ao gênero imperfeito *Sphaceloma*. Estas frutificações são semelhantes à forma *Sphaceloma* de *Elsinoë fawcetti* BITANC. & JENKINS (BITANCOURT e JENKINS 1936) sôbre Citrus, conforme se vê, por exemplo, nas ilustrações de JENKINS (JENKINS 1931, Est. 1, C e fig. 4).

O *Sphaceloma* do mamoeiro, o primeiro a ser encontrado sôbre uma Caricacea, é uma espécie nova, ainda não descrita.

Sphaceloma papayae sp. nov. JENKINS & BITANCOURT

Estampas 14, 15 e figura 1

Maculis foliicolis paucis vel numerosis, sparsis vel distributis super vel etiam secus nervos et venulas, praesertim in basali parte coalescentibus, irregularibus, epiphyllis vel hypophyllis, vel parumper amphigenis, singulis maculis circularibus, vel parum irregularibus, vulgo discoloribus, erumpentibus, bene limitatis,

(5) Os nomes das côres em inglês, entre parenteses, são da nomenclatura de Ridgway (Ridgway 1912).

asperulis, albidis ob lacerationem epidermidis sicci, olivaceo-pallidis et floccosis ob abundantiam conidiorum; 0,2 - 1,0 mm latis.

Maculis caulinis et petiolaribus necnon nervicolis elongatis, saepe per coalescentiam magnis, elevatis, albidis, conidiferis; surculis saepesaepius incrassatis ac distortis.

Fructificationibus e paucis conidiis (4-5) vel acervulis ex plectenchyma continuo et hyalino compositis, ex epidermate erumpentibus et usque 50 μ crassis; conidiophoris numerosis irregularibus, 6 - 12 × 4 - 5 μ magnis; conidiis flavidulis, singularibus vel catenulatis (2-3), obclavatis, oblongo-ellipsoides usque cylindraceis, apiculatis vel rotundatis vel raro acuminatis, 6 - 14 × 3 - 4 μ magnis, parietibus conidiorum minus quam 0,5 μ crassis.

Distributio: Africa aequatorialis, Territorii Tanganyika, Two Bridges, vic. Moshi (975 m s/m), ubi Sphaceloma papayae generat morbum appelatum "Scab of papaya" in foliis, petiolis et caulibus plantae Carica papaya L. (Caricaceae) (in collectione: Fungi of Tanganyika Territory, Dept. of Agriculture 180/1953, et in Herb. Inst. Biol. 6046 asservata (Typus)).

Fig. 1

A verrugose poderia ser confundida com certas doenças produzidas por virus, especialmente devido às manchas amarelas das fôlhas (WALLACE e WALLACE 1954). Pode também simular as lesões produzidas por *Asperisporium caricae* (SPEG.) MAUBL., conforme foi possível constatar durante as presentes pesquisas.

DESENVOLVIMENTO EM MEIO DE CULTURA

A cultura de *Sphaceloma papayae* isolada em Tanganyika exibiu os mesmos caracteres culturais em Tanganyika e em São Paulo. Tôdas as repicagens feitas em São Paulo, inclusive as utilizadas para inoculações, conforme se vê na secção seguinte, foram em meio de batata-dextrose-agar, de acôrdo com a formula correntemente usada para culturas de fungos na secção de Fitopatologia do Instituto Biológico (6). As repicagens são convenientemente feitas a partir de pequenos talos individuais, produzidos em grandes quantidades em tubos inoculados quando se esfrega um fragmento de cultura em toda a superficie do agar inclinado. Estas culturas, que designamos por "culturas preliminares", também se prestam à observação dos caracteres culturais. As conidias nelas produzidas serviram de inóculo nas experiências de inoculação. Para culturas gigantes em placas de Petri empregou-se um método anteriormente descrito (BITANCOURT e JENKINS 1950, p. 23, est. 7, fig. A). Este tipo de cultura foi utilizado principalmente para observação dos setores que frequentemente se formam nas culturas de crescimento lento de *Sphaceloma*.

A estampa 15, D e E, mostra duas dessas culturas em placa de Petri, incubadas durante dois meses a 24°C. O setor de côr clara, que ocupa a parte principal do talo, em E, iniciou seu desenvolvimento no fim do primeiro mês. Com exceção desse setor, a superfície das duas culturas, que tinham então 25 mm de diametro, era finamente corrugada e de côr de canela (*cinnamon brown*).

Em tubos de cultura com meio de agar inclinado, os talos são nitidamente salientes e convolutos, assemelhando-se muito aos de *Elsinoë fawcettii* (cf. JENKINS 1931, fig. 5, A e D). A coloração dessas culturas de *Sphaceloma papayae* passaram da côr de camurça (*chamois*) que tinham no fim de 5 dias de crescimento, à côr ocra (*ochraceous buff*) 10 dias mais tarde. Em outras culturas com 35 dias, o talo tinha côr parda vinacea (*vinaceous buff*) com distinto crescimento marginal de côr amarela. O meio de cultura apresentava então uma coloração verde amarelada. A cromogênese no meio de cultura já foi assinalada para diversas outras espécies de *Sphaceloma* como por exemplo *S. perseae* JENKINS (JENKINS 1934, p. 862).

Frutificações conidianas, correspondentes às que se vêem nas lesões do hospedeiro, observam-se formando tufos de côr cinzenta, na parte superior, mais seca, de culturas preliminares de *Sphaceloma papaye* novas (11 dias) ou velhas (35 dias). Os conidioforos, mais

(6) A formula e o método de preparação desse tipo particular de meio de batata-dextrose-agar estão descritos em Bitancourt e Jenkins, 1942, nota 13, meio "C".

atenuados nas culturas que nas lesões, suportavam conidias solitárias ou em cadeias de 2 a 3. Uma conidia de dimensões excepcionais (24 × 4 μ) foi observada. Estas frutificações conidianas permaneceram por longo tempo na superfície dos talos. Ao contrário, em *S. perseae,* frutificações semelhantes sòmente apareceram em culturas novas e eram de curta duração (JENKINS 1934, p. 862).

Nas culturas preliminares observou-se igualmente na superfície dos talos de côr parda vinacea, já mencionados, pústulas luzidias, de côr cinzenta palida, que, no microscopio, mostraram-se constituidas de conidias hialinas, medindo em media 6 × 3 μ. Estas aglutinações de conidias persistiram 3 semanas depois da primeira observação. No fim desse prazo algumas estavam secas, de côr baça, e um tanto destacadas do talo. A estampa 15, G, mostra uma quantidade dessas pústulas revestindo o crescimento coraloide de uma cultura feita em Tanganyika. Talos provenientes de massas conidiais da mesma natureza já foram assinalados para *Elsinoë australis* BITANC. & JENKINS (BITANCOURT e JENKINS 1937, p. 11 e est. 10, A).

INOCULAÇÕES

Inoculações foram feitas em plantinhas de mamoeiro crescidas a partir de sementes plantadas em vasos. As fôlhas menores (10 a 20 mm de comprimento) dessas plantas foram pulverizadas com conidias hialinas provenientes de culturas, suspensas em água, ou receberam pequenos chumaços de algodão ou tiras de papel filtro, esterilizados previamente e mergulhados na suspensão de conidias. As plantas foram mantidas numa câmara úmida de inoculação ou as partes inoculadas permaneceram umedecidas por um período de 48 horas. As experiências deram resultados positivos nas plantas inoculadas e negativos nas testemunhas. Estas últimas sòmente diferiam das inoculadas pela ausência de inóculo.

Para as duas experiências de inoculação, realizadas em laboratório em São Paulo, foram semeadas em caixas em 6 de outubro de 1953 sementes de frutas adquiridas no comercio. Em 7 de Novembro, as plantinhas desenvolvidas nessas caixas foram pulverizadas com a suspensão conidiana infetando-se, nessa ocasião, os ápices vegetativos em crescimento.

Na segunda experiência, realizada em 25 de Novembro, o inóculo, constituido por chumaços de algodão e tirinhas de papel filtro mergulhados na suspensão conidiana, foi colocado na face superior de fôlhas novas. De 13 fôlhas assim inoculadas 10 ficaram infetadas. As lesões tornaram-se visíveis a olho desarmado depois de

7 dias. Dois dias antes podiam ser observadas a contra-luz com uma lupa, na forma de pontuações translucidas. A fôlha mais intensamente infetada, então acentuadamente clorótica, apresentava cêrca de 50 lesões, espalhadas em tôda a sua superfície. Em outros casos, as lesões achavam-se localizadas e apresentavam clorose sòmente na area infetada. (Est. 15, fig. B). Por meio de micro-culturas de tecido o *Sphaceloma* foi reisolado de uma das fôlhas desse grupo.

INOCULAÇÕES CRUZADAS

Em Tanganyika, além de inoculações em mamoeiro com *Sphaceloma papayae,* foram realizadas inoculações cruzadas em fôlhas novas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) e plantinhas novas de mamoeiro de montanha (*Carica candamarcensis* HOOK f.), uma planta, como o mamoeiro, de origem americana, encontrada nos jardins em torno de Moshi, e de *Cylicomorpha parviflora* URB., uma árvore africana da familia das Caricaceas. Sòmente o mamoeiro se tornou infetado.

COMBATE

O combate à verrugose do mamoeiro, nas condições de Tanganyika, poderia ser tentado pela redução da umidade do ambiente, graças à supressão do mato e evitando-se de cultivar o mamoeiro perto de quebra-ventos de folhagem densa. E' provavel que pulverizações preventivas com fungicidas seriam tambem eficientes. Antes que se pudessem iniciar experiências em 1953, a doença diminuiu, sem ter sido combatida, no inicio da estação seca.

STUDIES IN THE MYRIANGIALES
VI. PAPAW SCAB, CAUSED BY SPHACELOMA

Abstract

"Scab" of papaw (or papaya), Carica papaya, was discovered in June 1953 causing a moderately severe outbreak in a young plantation near Moshi, Tanganyika. With ensuing dry weather the disease gradually disappeared. No other record of the malady is known.

Affected leaves become mottled, yellow and green. Together with the stems, they may be distorted; stems also may be swollen and suffer defoliation. Lesions are sparse to abundant on leaves, petioles and stems. They are scattered, or on leaves often con-

centrated on or alongside the veins. Through coalescence they may form irregular scabby areas on all affected parts.

The pathogen is described as a new species, Sphaceloma papayae JENKINS & BITANC. *In culture it produces both pale-coloured conidial growth corresponding to that described on the host, also hyaline conidia appearing in mass as glistening pustules on the surface of the thalli. Inoculations on papaw gave positive results and the organism was reisolated. No infection resulted from cross inoculations on castor bean, mountain papaw and Cylicomorpha parviflora.*

Tentative control measures for the scab as observed in Tanganyika are to reduce humidity as far as possible by keeping down weeds and by siting the plantation away from dense wind breaks. It is likely that spraying would be effective.

BIBLIOGRAFIA

ANÔNIMO — 1954 — 5.ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciencia, Curitiba 9 a 18 de Nov. Resumo dos trabalhos. *Rev. Bras. de Quim. (Ciencia e Ind.)* **36**: 94.

BITANCOURT, A. A. & JENKINS, A. E. — 1936 — *Elsinoë fawcetti*, the perfect stage of the citrus scab fungus. *Phytopath.* **26**: 393-396.

BITANCOURT, A. A. & JENKINS, A. E. — 1937 — Sweet orange fruit scab caused by *Elsinoë australis. Jour. Agr. Res.* **54**: 1-18.

BITANCOURT, A. A. & JENKINS, A. E. — 1942 — New discoveries of Myriangiales in the Americas. *Proc. Amer. Sci. Congr. 8th,* Washington 1940, **3**: 149-172.

BITANCOURT, A. A., & JENKINS, A. E. — 1950 — Estudos sôbre as Miriangiales II. Vinte novas especies de Elsinoaceas neotropicais. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo **20**: 1-28.

GREENWAY, P. J., WALLACE, G. B., WALLACE, M. M. & KHOMO, E. V. R. — 1953 — The papaw. Its botany, cultivation, diseases and chemistry. *Dept. Agriculture Tanganyika, pamphlet no.* 52. 32 pp.

JENKINS, A. E. — 1931 — Development of the citrus scab organism, *Sphaceloma fawcettii. Jour. Agr. Res.* **42**: 545-558.

JENKINS, A. E. — 1934 — *Sphaceloma perseae*, the cause of avocado scab. *Jour. Agr. Res.* **49**: 859-869.

JENKINS, A. E., WALLACE, G. B. & BITANCOURT, A. A. — 1953 [1954] — Verrugose do mamoeiro, causada por *Sphaceloma* (Abs.) *Cien. e Cult.* **5**: 212.

RIDGWAY, R. — 1912 — Color standards and color nomenclature. 43 pp. Washington, D. C.

WALLACE, G. B. & WALLACE M. — 1954 — Tanganyika fungus list. Recent records N. XVII. *Tanganyika Dept. Agr. Mycol. Circ.* 34, 8 pp.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 14

Fig. *A* — Face superior de fôlhas novas e haste de mamoeiro gravemente atacadas de verrugose. Do especimen tipo. × 1.

Fig. *B* — Parte basal de uma das fôlhas. × 9.

Estampa 15

Fig. *A* — Face inferior das fôlhas e haste representadas na estampa 14. × 1.

Fig. *B* — Parte de uma fôlha nova mostrando lesões resultando de inoculação experimental. × 5.

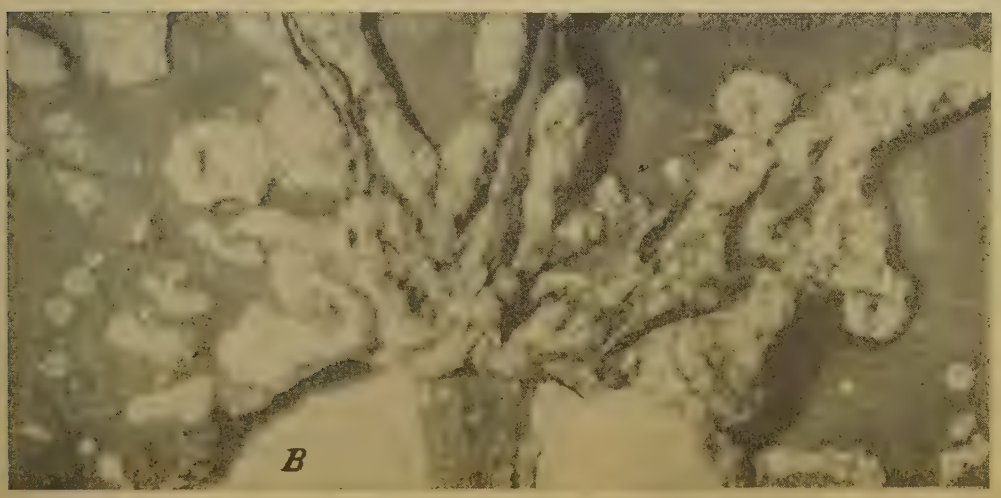
Fig. *C* — Secções mostrando abundantes frutificações conidianas de *Sphaceloma papayae* na superficie de uma lesão. Do especimen tipo (ver também a figura 1, no texto). × 500.

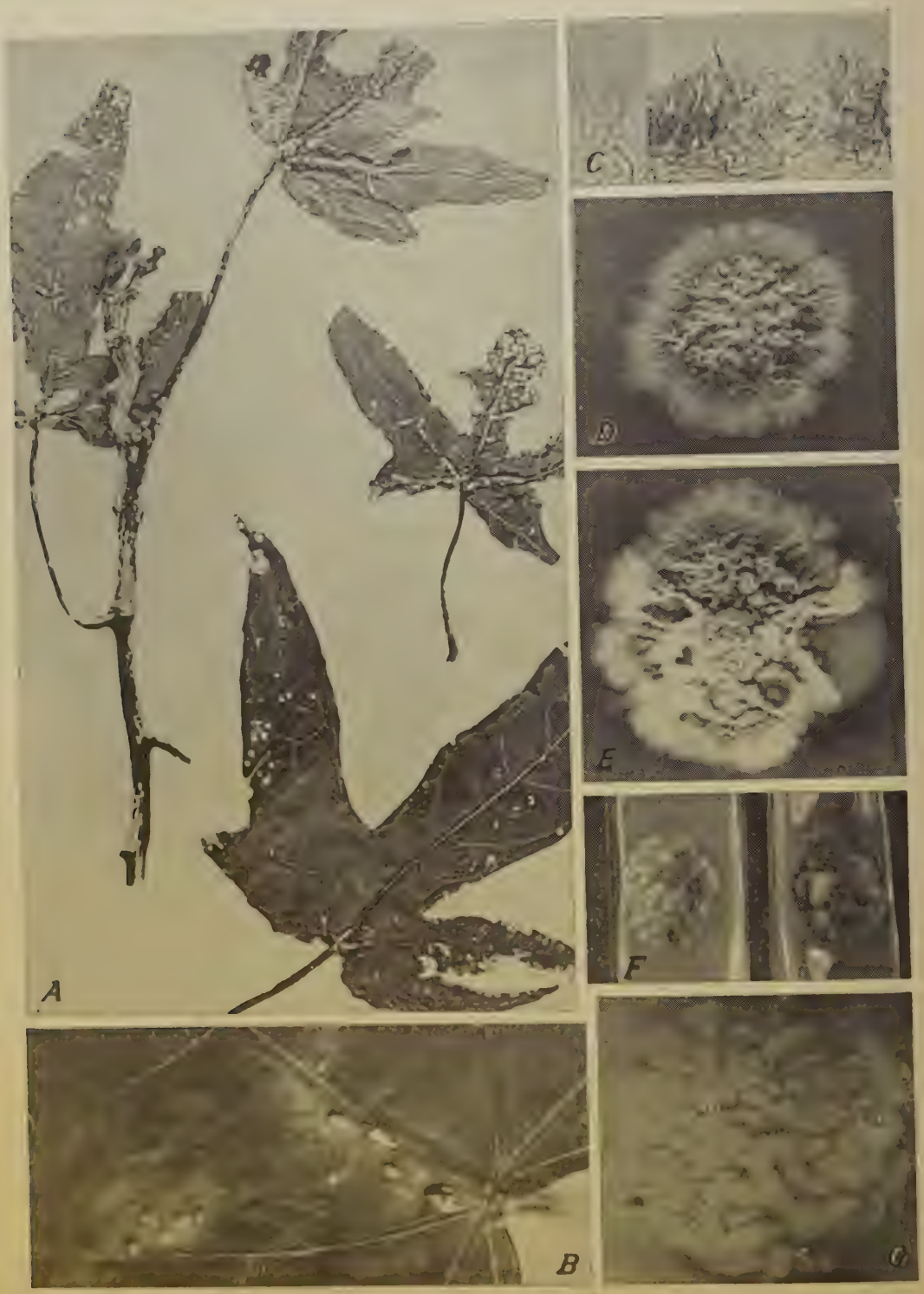
Fig. *D* e *E* — Culturas de dois meses de *S. papayae* em meio de batata-dextrose-agar em caixa de Petri. Notam-se em E as porções cobertas de penugem branca, correspondentes aos setores formados cedo, no meio da cultura típica × 1.

Fig. F — Dois tubos de cultura de agar inclinado, do mesmo meio, com 2 semanas. × 1.

Fig. *G* — Massas conidianas de *S. papayae* revestindo as convoluções normais de uma cultura em meio de batata-dextrose-agar. × 2½.

A


B


A
B
C
D
E
F
G

Vol. 22 — Artigo 11 Novembro de 1955

O TESTE DE FIXAÇÃO EM SUPERFÍCIE, DE CASTAÑEDA, PARA O DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE. OBSERVAÇÕES SOBRE SUA EXECUÇÃO E LEITURA

POR

A. D. Caldas, L. Pouza Machado e N. Planet

Seção de Higiene Comparada

Do Instituto Biológico de S. Paulo

CASTAÑEDA (1) (2) descreveu uma nova técnica de exame sorológico para fins diagnósticos nos casos suspeitos de brucelose. Esta técnica é aplicável tanto para humanos como para animais.

Os dados apresentados pelo autor nos citados trabalhos são deveras sugestivos. Assim é que, em 590 casos de brucelose humana, comprovados pela hemocultura ou pela presença no sangue de um alto teôr de aglutininas específicas, e nos quais foram efetuados 906 exames, o teste de fixação em superfície apresentou uma concordância de 100%. Ainda deve ser ressaltado que neste numeroso grupo de ensaio, o teste da soro-aglutinação falhou em 3% dos casos, ou seja, 27 soro-aglutinações foram negativas em indivíduos nos quais a infecção foi comprovada pela positividade da hemocultura. Em todos esses casos o teste de fixação em superfície foi positivo.

Outro ponto de importância é o que se refere aos títulos aglutinantes baixos, isto é, inferiores a 1:100. Convencionalmente tais títulos não são considerados significativos de uma infecção brucelótica, a menos que existam outras evidências da doença, especialmente a hemocultura positiva. Neste grupo especial o teste de CASTAÑEDA permitiu importante diferenciação. Assim é que, dos citados 906 exames, 113 (12%) revelaram aglutininas em títulos iguais ou inferiores a 1:80. Em todos o teste de fixação em superfície foi positivo. Esses resultados demonstraram uma grande sensibilidade da prova em questão.

A contraprova de sua especificidade, ainda segundo os dados de CASTAÑEDA, foi demonstrada em um grupo controle de 221 pacientes portadores de infecções diversas, excluindo a brucelose. Em todos os casos o teste de fixação em superfície foi negativo. Acresce considerar que nesse grupo, alguns casos apresentavam títulos aglutinantes para brucela nos níveis de 1:20 a 1:80.

Resultados igualmente nítidos foram obtidos por CASTAÑEDA com soros bovinos, embora com esse material, observasse ligeira

discrepância (2 casos negativos em um lote de 81 bovinos reagentes em título superior a 1:100).

Os atraentes resultados obtidos por CASTAÑEDA levaram-nos ao estudo do assunto, pelo interesse que temos em nosso serviço pelos problemas relacionados com a brucelose humana e animal.

As observações que realisamos sobre o teste descrito por CASTAÑEDA e que são objeto do presente trabalho, as fizemos como parte de estudo mais amplo que estamos executando presentemente.

O TESTE DE CASTAÑEDA; PREPARO DO MATERIAL; EXECUÇÃO E LEITURA

Seguimos em suas linhas gerais as indicações do autor em suas publicações (1) (2).

O antígeno utilizado foi uma suspensão espessa de germens a qual normalmente mantemos em estoque para a preparação dos antígenos rápido e lento que utilizamos em nosso laboratório na execução das soro-aglutinações. A técnica de obtenção dessa suspensão é detalhadamente descrita em trabalho anterior (3) e a denominamos de emulsão-mãe. Uma quantidade correspondente a 50 ml dessa suspensão foi centrifugada a 3.000 rotações por meia hora e o sedimento ressuspenso no menor volume possível de água destilada. 10 ml dessa suspensão muito espessa são tratados com 3 ml de uma solução à 0,5% de sulfato férrico; depois de bem misturada adiciona-se 0,5 ml de uma solução aquosa de hematoxilina. Deixa-se em contacto por 24 horas e em seguida centrifuga-se, primeiramente à baixa rotação para afastar possíveis grumos e material precipitado, despresando-se o sedimento, em seguida a 3.000 rotações, despresando-se o sobrenadante. O sedimento resultante e que consiste numa massa de brucelas coradas pela hematoxilina, é então ressuspenso em uma solução quasi saturada de açucar refinado (aproximadamente 900 gramas por litro). A incorporação dessa massa de brucelas a essa solução xaroposa deve ser feita cuidadosamente e em gral. Utilizamos 4 volumes da solução de sacarose para 1 volume da suspensão. O resultado é um líquido muito espesso de cor azul escuro, quasi preto.

Como não dispusessemos de papel de filtro da qualidade especificada por CASTAÑEDA utilizamos para a impressão das manchas de antígeno, papel de filtro para cromatografia (Whitemann n.º 1) e, ainda, outra qualidade (Shark Skin — C. Schleicher & Schüll Co. — N. Y.). Ambos ofereceram resultados satisfatórios, si respeitadas as demais condições.

As manchas eram feitas com um bastão metálico de extremidade romba com a qual tocava-se a suspensão do antígeno. A pequena gota assim retirada é colocada em pontos previamente marcados no papel de filtro e espalhadas com um firme e delicado movimento circular. Dessa maneira obtem-se, com um pouco de prática, círculos quasi perfeitos e bem iguais, tanto em relação ao tamanho como em intensidade de côr, condições essas de suma importância para a perfeita leitura do teste.

O papel foi previamente cortado e assinalado nos pontos de impregnação do antígeno, nas dimensões e distâncias descritas por CASTAÑEDA.

Nosso material, assim preparado, quando comparado com os papeis originais de CASTAÑEDA (1) muito a esses se assemelha, si bem que, as manchas de antígeno não sejam tão negras. De qualquer maneira pudemos compará-los em várias circunstâncias e para efeito de realização do teste e leitura dos resultados, não encontramos qualquer discrepância, exceto no que se refere a conservação. Nesse particular os papeis preparados por nós, apresentam uma particularidade desfavoravel e para a qual não sabemos a explicação: eles "envelhecem" e por esse motivo devem ser usados no maximo dentro de duas semanas após sua confecção. A utilização de papeis preparados há mais tempo dificultam a leitura dos resultados, podendo mesmo, falseá-los.

Ao contrário do que recomenda CASTAÑEDA, nossa experiência mostrou que os papeis podem ser usados imediatamente após seu preparo. Estabelecemos como praxe utilizar unicamente os papeis preparados dentro de uma semana.

Nossa experiência com o teste de fixação de superfície inclue sôros humanos, suinos e bovinos. Para a execução do teste coloca-se uma gota de sôro sobre a mancha de antígeno em quantidade suficiente para recobri-la inteiramente. Exceto para os casos de exames isolados, caso em que se faz necessário a inclusão de dois sôros conhecidos (negativo e positivo) para comparação, habitualmente fazemos o teste em séries de 6 em um único bloco de papel. Não convem usar blocos maiores, para evitar secar inteiramente o sôro, o que não deve acontecer. Quando a princípio utilizavamos blocos maiores (10 ou 12 manchas), verificamos que os testes feitos no princípio da série ofereciam resultados de difícil leitura. No caso de exames em série como os que realizamos e em blocos de 6, não há necessidade de juntar sôros controles em cada bloco.

---

(1) Agradecemos ao Prof. Carlos da Silva Lacaz, da Faculdade de Medicina da Universidade de S. Paulo, ter-nos cedido, gentilmente, alguns blocos de papel original de Castañeda.

A presença de hemoglobina dissolvida no sôro não afeta de modo algum os resultados. Apenas, nesses casos, o rasto azul do antígeno é precedido de um halo avermelhado facilmente diferenciável.

Um fato que observamos e que nos parece de importância, é que os sôros contendo lipídeos em quantidade exageradas, interferem com o teste falseando-os completamente. Esse fato foi-nos presente com muita nitidês quando trabalhamos com sôros de suinos. De fato, é relativamente frequente o sangue desses animais apresentar aspecto leitoso, o que é característico de uma exagerada lipemia. Os testes realisados com os sôros dessa qualidade mostram reações falsas positivas. Esse fato chamou-nos a atenção e pudemos demonstrar a procedência de nossa suspeita. Desengordurando esses sôros, seja com clorofórmio, seja centrifugando-os após o resfriamento, o que não prejudica a execução ulterior do teste, as falsas reações são afastadas.

Outra prova da interferência de gordura na execução do teste foi obtida com o estudo que fizemos da reação de fixação de superfície utilizando leite de vacas, sãs ou portadoras de brucelose. Esse estudo que será objeto de um trabalho a parte, permitiu-nos demonstrar que o leite total, quando usado "in natura" não se presta para a execução do teste, no entanto, a simples desnatação por centrifugação permite utilizá-lo para o teste, sendo que, diga-se de passagem, os resultados são perfeitamente concordantes com os demais exames.

A leitura do teste é feita seguindo a subida da solução fisiológica através do papel e até que essa atinja uma altura aproximada de 6 cm. O tempo suficiente para tal, é de mais ou menos 15 minutos. Como a leitura do teste se faz por comparação é de interesse acompanhar o rasto que se vae formando. Os sôros negativos apresentam característico rasto azul sendo que o limite superior da côr segue praticamente o bordo úmido deixado pela solução fisiológica. Nos sôros positivos o rasto azul é sempre menor não atingindo a mesma altura do sôro negativo que lhe serve de comparação. A intensidade da reação é lida em *concordância com a altura do rasto.* Nos sôros que tem índice de fixação de 100% a mancha de antígeno quasi não se altera, no máximo forma-se um pequeno cône em sua parte superior. Nos sôros que dão reações parciais a leitura é feita considerando-se 25, 50 ou 75 por cento da altura do rasto controle. Em nossa experiência esse critério, usado exclusivamente, deu ótimos resultados. Não é aconselhável ultrapassar o tempo mínimo necessário para que o controle negativo dê um rasto nítido e que se eleva cerca de 3 ou 4 cm da mancha. Nesse momen-

to deve-se retirar o bloco do banho em que sua extremidade está mergulhada e proceder-se a leitura.

Os papeis utilizados no teste são postos a secar entre folhas de papel de filtro, e podem ser conservados para documentação. Com o tempo, no entanto, a côr azul tem tendência a descorar-se e vae-se acentuando a côr de ferrugem do sulfato férrico.

Nossa experiência com o teste de CASTAÑEDA baseia-se em cerca de 1.200 exames procedidos em sangue humano e de animais (suinos e bovinos) e em leite proveniente de vacas suspeitas de brucelose.

Os resultados obtidos com esse material serão objeto de trabalho a ser apresentado oportunamente.

SUMÁRIO

Os autores realizaram cerca de 1.200 testes de fixação em superfície em sangue humano, de bovinos e de suinos, suspeitos de brucelose, e em leite.

Como resultado de suas observações puderam estabelecer certos detalhes referentes a técnica da reação, dos quais desejam salientar:

a) preparo do antígeno e técnica de impregnação; b) qualidade do papel de filtro a ser empregado; c) envelhecimento das manchas de antígeno; d) interferência dos lipídeos no teste; e) nenhuma interferência da hemoglobina; f) normas para a leitura do teste.

SURFACE FIXATION METHOD OF CASTAÑEDA FOR THE DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS. OBSERVATIONS ABOUT ITS EXECUTION AND READING

Abstract

The AA performed about 1.200 surface fixation tests with human, bovine and swine blood sera suspected of brucellosis, and with milk of infected and normal animals.

According the results of their observations were established certain details referring to the reaction technique, particularly:

1. preparation of the antigen and print technique. 2. quality of the filter paper to be used. 3. oldness of the antigen spots. 4. fat interference in the test. 5. no hemoglobin interference. 6. directions for the reading of the test.

BIBLIOGRAFIA

1 — CASTAÑEDA, M. R. — 1950 — Surface fixation. A new method de detecting certain immunological reactions. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* **73**: 46.

2 — CASTAÑEDA, M. R. — 1953 — Surface fixation as a practical method for diagnosis of brucellosis in man and animals. Ibidem **83**: 36.

3 — AMARAL, J. P., TAUNAY, A. de E., NOVAES, J. R. C., PLANET, N. ESTEVES, M. B. — 1953 — Brucelose humana no Estado de São Paulo. Inquerito Sorológico. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* **13**: 169.

Vol. 22 — Artigo 12 Novembro de 1955

ESTUDOS SÔBRE O CÂNCER VEGETAL

I. A NATUREZA QUÍMICA DAS AUXINAS DE ALGUNS TECIDOS VEGETAIS NORMAIS E TUMORAIS

POR

Käthe Schwarz, Renata Dierberger e A. A. Bitancourt

Do Centro de Estudos sôbre o Câncer dos Vegetais
e do Instituto Biológico

com 5 figuras no texto e estampa 16

INTRODUÇÃO

Em janeiro de 1952 foi criado no Instituto Biológico do Estado de São Paulo, o Centro de Estudos sôbre o Câncer dos Vegetais, graças a uma subvenção do Conselho Nacional de Pesquisas, renovada em 1953 e suplementada pelo Fundo de Pesquisas do Instituto Biológico. As duas primeiras autoras do presente trabalho foram pesquisadoras do Centro de 1952 a 1954.

No programa dos trabalhos do Centro destaca-se pela sua importância o estudo do mecanismo da tumorização, ou seja do fator ou fatores que determinam a transformação de uma célula normal em célula tumoral. De acordo com os conhecimentos atuais, o caráter mais importante dessa transformação é, na nossa opinião, o aparecimento, na célula tumorizada, de quantidades de auxinas livres superiores às que existiam na célula antes de sua transformação. O tecido de tumor é, por consequência, mais rico em auxinas livres que o tecido normal de onde ele provém (LINK e EGGERS 1941, KULESCHA e GAUTHERET 1948, HENDERSON e BONNER 1952). Êste fato é talvez suficiente para explicar porque os tecidos de tumor podem crescer *in vitro* em meios de cultura desprovidos de auxinas, ao passo que a maioria dos tecidos normais só pode crescer indefinidamente em meios de cultura artificiais quando nestes foi incorporada uma quantidade suficiente de alguma auxina, natural ou de sintese (GAUTHERET 1947, 1948, 1949).

As auxinas, ou sejam os hormonios vegetais de crescimento devem portanto desempenhar um papel de importância considerável no mecanismo de tumorização e a primeira questão que surge é qual a natureza química desses hormonios.

Si pusermos de parte as auxinas *a* e *b* cuja existência real é hoje posta em dúvida por diversos autores e que, depois de sua descoberta, nunca mais puderam ser postas em evidência, inclusive em trabalhos bem recentes (WIELAND et al 1954), as únicas auxinas de-

vidamente identificadas por suas propriedades físicas e químicas são diversos derivados indólicos, dos quais o mais importante é o ácido indolacético (AIA). Devido às quantidades extremamente pequenas de auxinas existentes no estado livre nos tecidos vegetais, sòmente algumas delas como o ácido indolacético, o seu ester etilíco (IAE) e o indolacetonitrila (IAN) foram identificadas por isolamento químico, cristalização no estado puro e reconhecimento de propriedades físicas e químicas. Até últimamente a identificação das auxinas era feita por diversos métodos indiretos e pouco específicos que forneciam resultados de precisão duvidosa.

A introdução do método de cromatografia sobre papel trouxe neste campo como em tantos outros da química biológica, um elemento de precisão que permitiu a diversos autores a identificação das auxinas de diversos tecidos vegetais (BITANCOURT 1955).

Do nosso conhecimento, entretanto, nenhuma aplicação do método de identificação das auxinas pela cromatografia sobre papel tem sido feita, com os extratos de tumores vegetais. O presente trabalho apresenta os resultados de estudos sôbre a natureza das auxinas de alguns tecidos vegetais, normais e de tumor, feitos com essa técnica. Uma nota previa sobre este trabalho foi publicada ha tempo (BITANCOURT, SCHWARZ e DIERBERGER 1954).

E' com o máximo prazer que consignamos aqui os nossos agradecimentos aos membros do Conselho Nacional de Pesquisas e do Conselho do Fundo de Pesquisas do Instituto Biológico, pelos auxílios que permitiram a manutenção do Centro de Estudos sôbre o Câncer dos Vegetais até fins de 1954; ao Professor GAUTHERET e ao Dr. G. MOREL por nos terem cedido algumas das cepas de culturas de tecidos que empregamos; ao Professor MINGOIA e ao Dr. PAULO CARVALHO FERREIRA que nos orientaram e auxiliaram (K. S.) na síntese de diversos derivados indólicos e mais especialmente do indolacetonitrila, utilizados nestes estudos; ao Prof. HANS STAMMREICH por valiosas sugestões em questões relativas à espetroscopia; à Fundação Rockefeller pela doação de parte do material de laboratório que utilizamos, e aos colegas SYLVIA ANDRADE, K. SILBERSCHMIDT, M. MENEGHINI e M. KRAMER, por indicações úteis a respeito de tecnicas de laboratório.

MATERIAIS E METODOS

Origem dos tecidos utilizados

A maior parte dos tecidos utilizados nestes estudos era cultivada *in vitro* de acordo com a técnica de GAUTHERET (1942). A origem dessas culturas consta da tabela 1.

TABELA 1

Culturas de tecidos vegetais *in vitro*, utilizadas na preparação de extratos destinados à identificação das auxinas

N.º	Espécies	Data do isolamento	Autor
1	*Nicotiana tabacum* L.	?	G. Morel
5	*Parthenocissus tricuspidata* ..... (Sieb. & Zucc.) Planch.	?	G. Morel
8	*Helianthus annuus* L.	25-2-48	A. A. Bitancourt
18	*Salix babylonica* L.	16-3-48	A. A. Bitancourt
23	*Nicotiana langsdorffii* Weinm. × *N. glauca* Graham	11-3-49	A. A. Bitancourt
31	*Ruta graveolens* L.	26-6-52	M. L. M. Campos

A cultura n.º 5, de *Parthenocissus tricuspidata*, é de tecido normal. As outras culturas são de tecidos de tumores, as de n.º 1, 8, 18 e 31, isoladas de tumores produzidos experimentalmente pela inoculação de *Agrobacterium tumefaciens* (Sm. & Towns.) Conn. e a n.º 23 de tumores espontaneos, de origem genética, do híbrido de *Nicotiana langsdorffii* × *N. glauca* (Bitancourt 1955).

Os tecidos foram geralmente cultivados em meio de Knop diluido à metade de sua concentração usual, adicionado de sais minerais de microelementos e, em alguns casos, de fatores de crescimento, de acordo com a técnica de Gautheret (1942). Recentemente temos usado no lugar do meio de Knop um meio estudado por Heller e que nos foi comunicado por Gautheret (1).

Este meio tem a seguinte composição:

Agua bidestilada	1000 cm³
Nitrato de potassio	1,0 gr
Sulfato de magnesio, 7 aq	0,25
Cloreto de cálcio, 4 aq.	0,20
Fosfato de amonio monobásico	0,60
Sacarose	30,00
Agar	10,00

A este meio são acrescentados os mesmos microelementos e fatores de crescimento que na fórmula de Gautheret. Diante dos excelentes resultados dados pelo emprego da água de côco para o crescimento de certos tecidos em cultura (Caplin & Stewart 1948) temos acrescentado regularmente 15% desta água, tirada de cocos maduros, nos meios que empregamos.

(1) Comunicação pessoal ao terceiro autor.

Além destes tecidos cultivados, foram pesquisadas as auxinas do endosperma da semente de milho (*Zea Mays* L.) e das pontas de coleoptila de plântulas de aveia (*Avena sativa* L.) germinadas. As sementes de milho, da variedade "catete" eram amolecidas dentro d'água durante 24 horas, o que produz um início de germinação. O endosperma era então separado dos tegumentos e do embrião. No caso dos coleoptilas de aveia foram aproveitados os 5 mm terminais de coleoptilas usados para os testes biológicos conforme está descrito adiante. Para se obter uma quantidade suficiente dessas pontas, elas foram, cada vez que se faziam testes, colocadas em pequenos frascos que foram guardados no congelador de um refrigerador doméstico. Os extratos foram preparados com as pontas de coleoptilas assim acumuladas durante muitos meses.

Existem diversas técnicas para a extração das auxinas dos tecidos vegetais, as quais empregam água ou diferentes solventes orgânicos, como o éter etílico, o álcool etílico, o clorofórmio, etc. O método mais usado é o de VAN OVERBEEK (1938) que consiste em colocar o tecido em éter etílico saturado d'água, durante várias horas a baixa temperatura. Esta extração fornece as chamadas "auxinas livres". Se a extração é feita à temperatura do laboratório e por longo tempo, a maioria dos tecidos fornece uma quantidade de auxina várias vêzes maior que a extração a baixa temperatura e por tempo curto. Acredita-se que além das auxinas livres, uma certa quantidade desses hormonios está ligada a proteinas e que enzimas proteoliticas as põem em liberdade durante o processo de extração à temperatura ambiente. Uma certa quantidade de ácido indolacético também pode ser produzida enzimaticamente a partir do triptofana existente nos tecidos.

De um modo geral, procedemos à extração das auxinas pelo éter da seguinte maneira: de 30 a 50 gramas de tecido são colocados em 400 cm^3 de éter etílico, previamente privado de peróxidos pelo método de Garbarini (2). O éter é saturado d'água, o que exige aproximadamente 2 cm^3 d'água por litro de éter, à temperatura de 24°C. Para os tecidos ricos em água não é necessário acrescentar água ao éter.

Os tecidos a extrair são deixados em contáto com o éter durante 24 horas, à temperatura de 5°C. O éter é em seguida decantado e evaporado, até redução a um volume inferior a 1 cm^3. O

(2) O éter etílico comercial, mesmo redestilado, contem quantidades apreciáveis de peróxidos que destróem rápidamente o ácido indolacético dos extratos vegetais. Para eliminar esses peróxidos, 1000 cm^3 de éter são sacolejados com 5 gr. de hidroxido de cálcio e 10 gr de sulfato ferroso, e em seguida destilados em presença dessas substâncias. Como os peróxidos formam-se espontaneamente no éter etílico no fim de alguns dias, é necessário utilisar nas extrações éter recentemente purificado.

extrato assim obtido pode então ser utilizado para preparação de um cromatograma, conforme será explicado adiante.

O extrato de auxina pode ser dividido em duas frações. Para êste fim o extrato etéreo não é evaporado e recebe uma solução de bicarbonato de sódio a 1%, a razão de um volume dessa solução para 8 volumes de éter. Os dois líquidos são separados e a solução de bicarbonato é acidificada com ácido tartárico até que o pH seja abaixado a 3. A solução é então extraída sucessivamente com duas porções de éter de 200 cm^3, em seguida juntadas uma à outra.

Neste processo de dupla extração, as substâncias alcalinas e neutras como certas auxinas: IAN, IAE, permanecem no primeiro éter (fração A) enquanto que as substâncias de reação ácida como o AIA, passam para o bicarbonato e, depois de acidificação, novamente para o éter (fração B).

Derivados indólicos utilisados

Para identificar as auxinas dos extratos vegetais é indispensável compará-las com substâncias sintéticas, quìmicamente puras. Utilizamos nas nossas comparações derivados indólicos adquiridos no comércio ou sintetizados em São Paulo. O ácido indolacético, ácido indolpropiónico, ácido indolbutírico, triptofana e indol, encontram-se correntemente no comércio e foram por nós adquiridos por importação dos Estados Unidos. O escatol nos foi gentilmente cedido pelo Prof. Q. MINGOIA. Recentemente a Bios Laboratories Inc., de Nova York pôs à venda um certo número de derivados indólicos até ultimamente não encontrados no comércio, tendo nós adquirido dessa firma o indolacetonitrila, aldeido indólico, ácido indolpirúvico e aldeido indolacético. Os dois ultimos produtos, entretanto, eram provavelmente impuros e deram resultados incertos na cromatografia e nas reações coloridas.

Um certo número de derivados foi por um de nós (K. S.) obtido por síntese nos laboratórios do Prof. MINGOIA, que orientou as operações, na Faculdade de Farmácia. São eles a gramina, o IAN e o IAE.

A síntese da gramina foi feita segundo KUEHN e STEIN (1937) por condensação do indol com aldeido fórmico e dimetilamina, em ambiente de acido acético glacial. O IAN foi obtido segundo a técnica recente de HENBEST, JONES e SMITH (1953), por reação da gramina com cianeto de potassio e iodeto de metila em solução metanolica. Finalmente, a esterificação do AIA para obtenção de IAE, foi

realizada mediante acido clorídrico gasoso conforme a técnica indicada por JACKSON (1930); o ester foi purificado por destilação no vácuo (5-6 mm Hg) a 187°C.

Cromatografia sobre papel dos derivados indólicos

Os cromatogramas preparados com soluções relativamente concentradas de derivados indólicos prestam-se à revelação com testes coloridos aplicados no papel ou pela visualização direta das substâncias em luz ultra-violeta, graças à fluorescência de algumas delas. Podem-se tambem utilizar testes biológicos quando as quantidades cromatografadas são pequenas. A localização das substâncias por qualquer desses processsos no cromatograma permite o calculo de seus Rf (ou seja da relação entre as distâncias percorridas pela substância desde o ponto inicial onde ela foi colocada e pela frente do solvente) e a posterior identificação dessas mesmas substâncias nos cromatogramas de extratos vegetais. A técnica que utilizamos foi descrita em detalhe num trabalho recente de um de nós (BITANCOURT 1955).

Existem diversas reações coloridas que podem ser usadas para revelar os cromatogramas de derivados indólicos. A mais sensível, pelo menos para o AIA, é obtida com o reagente de SALKOWSKI, a base de cloreto férrico, de que existem diversas formulas. Utilizamos principalmente a seguinte:

Água	300 cm³
Ácido sulfúrico concentrado .	200 "
Cloreto férrico M/2	10 "

A presença de ácido sulfúrico em concentração elevada apresenta dois inconvenientes. Em primeiro lugar é pouco comodo aplicar o reagente, conforme se costuma fazer em cromatografia sobre papel, por meio de pulverização na superfície do cromatograma. Em segundo lugar o ácido destroi o papel no fim de um a dois dias. Não é possível portanto conservar os cromatogramas revelados com esse reagente. Por este motivo alguns autores têm procurado substituir o ácido sulfúrico por outro ácido mais fraco como o ácido acético ou o ácido perclórico que atacam menos o papel, ou mesmo suprimir completamente o ácido, aplicando somente uma solução de cloreto férrico puro. Temos verificado que estas modificações do reagente fornecem uma reação colorida muito mais fraca que o reagente usual e por este motivo temos geralmente usado este último, a pesar de seus inconvenientes.

Procede-se da seguinte maneira à revelação dos cromatogramas pelo reagente de SALKOWSKI: o cromatograma, retirado do recipiente de cromatografia é secado à temperatura ambiente, geralmente numa corrente de ar, e aplicado na superfície de uma folha de papel filtro embebida com o reagente. Esta operação deve ser feita com cuidado para evitar que o reagente penetre mais rápidamente em algumas partes do cromatograma do que em outras, pois neste ultimo caso o reagente circula lateralmente, por capilaridade, das áreas já molhadas para as outras ainda secas, o que pode produzir um deslocamento de substância na direção dessa circulação. E' pois importante que a folha de papel filtro que recebe o reagente não esteja excessivamente embebida com este último e que a aplicação do cromatograma seja feita da maneira a mais uniforme possível.

Uma vez embebido o cromatograma é ele levado a uma platina aquecedora. Em cerca de 30 segundos de calor brando aparecem manchas ou "spots", com coloração característica, se as auxinas estiverem em concentração suficiente. E' preciso acompanhar atentamente a operação e interrompê-la a tempo para evitar a carbonisação do papel por excesso de calor.

De todos os derivados indólicos que experimentamos o AIA é o mais sensível ao reagente de SALKOWSKI. Um "spot" de 4 mm de diametro de uma solução a 10^{-3}, que contem aproximadamente 1 µg de AIA, fornece, após cromatografia nas nossas condições experimentais, um "spot" colorido de aproximadamente 1 cm de diâmetro, de coloração rosa palida perfeitamente visível. Em condições favoráveis uma quantidade de AIA da ordem de 0,25 µg pode ainda ser detectada no cromatograma.

Os outros derivados indólicos fornecem spots de coloração diferente da do AIA e muito mais palidos. Precisam portanto ser aplicados em quantidades maiores para poderem ser revelados no cromatograma.

Além do reagente de SALKOWSKI e suas modificações com ácido perclórico ou sem ácido, empregamos para as reações coloridas dos cromatogramas o reagente ao nitrito de sódio (solução alcoolica a 1%, seguido da ação de vapores de ácido clorídrico) e o aldeido p-dimetilaminobenzoico (DABA).

Em vez de aplicar diretamente os reagentes no papel do cromatograma, pode-se cortar este último em diversas tiras paralelas à linha de partida, as quais são extraídas pelo éter. O extrato, evaporado, num tubo ou melhor no fundo de uma pequena cápsula de porcelana, é tratado com algumas gotas do reagente. Para a reação

em tubos utilizamos, além dos reagentes acima citados o formaldeido de que se despejam algumas gotas no tubo e em seguida algumas gotas de acido sulfúrico concentrado. Estas últimas são despejadas de forma a escorrer ao longo das paredes e juntam-se no fundo, sem se misturar com o formaldeido. No menisco de separação dos dois líquidos aparece um anel colorido, com cor caraterística de cada derivado indólico.

Os derivados indólicos, quando presentes em quantidade suficiente, podem ser observados diretamente no cromatograma sob a luz ultra-violeta, devido à fluorescencia que possuem. Esta fluorescência é fraca no caso do AIA, mas é bastante intensa no do IAN e principalmente no aldeido indólico (AI).

A tabela 2 resume as diversas reações coloridas que utilizamos para caraterizar os derivados indólicos.

TABELA 2

Reações coloridas e fluorescência de diversos derivados indólicos. A côr indicada é a de um "spot" contendo de 1 a 20 μg da substância, numa folha de papel filtro, salvo no caso do formaldeido em que a côr é a do menisco de separação entre o reagente e o ácido sulfúrico concentrado.

Reagente	AIA	IAE	IAN	AI	Indol	Escatol
Salkowski	roseo	roxo	azul	roseo	roxo	amarelo
$FeCl_3$-ac. perclorico	roseo	roseo-amarelo	lilaz	amarelo		
$FeCl_3$	roseo	nada	laranja	amarelo		
Nitrito	roseo	roxo	azul	roseo		
p-DABA	roseo	roseo-amarelo	nada	amarelo	roseo-amarelo	azul, depois ocra
Formaldeido	amarelo	amarelo	lilaz	roseo	vermelho	amarelo
Fluorescência	verde fraca		amarela intensa	rosea intensa	rosea	verde

Os "spots" do ácido indolpropionico e do ácido indolbutirico sobre papel filtro com o reagente de SALKOWSKI são de coloração ocra. Com o triptofana a mancha é a princípio amarela e depois de 24 horas torna-se cinzenta azulada com ligeiro deslocamento para baixo ou seja, diminuição do valor de Rf.

Um quarto método de localização dos derivados indólicos nos cromatogramas aproveita a absorção dos raios ultra-violetas por estas substâncias na região de 2600-2800 A. Pode-se localizá-los nos cromatogramas pelo processo fotografico utilizado por MARKHAM e SMITH (1949) para purinas e pirimidinas. Utilizamos de acordo

com as indicações do prof. STAMMREICH um filtro de vidro Corning Red Purple Corex A 986, combinado com uma célula de paredes de quartzo, contendo uma solução de nitrito de sódio a 1%, com 1 cm de espessura a que se acrescentou algumas gotas de ácido clorídrico concentrado. A lâmpada usada é de mercurio, a baixa pressão. O cromatograma é feito com papel Whatman n.º 1, previamente lavado cuidadosamente pois ele contem substâncias que absorvem os raios U. V., as quais, quando se usa a água como solvente, têm Rf elevado sendo cromatografadas junto com diversos derivados indólicos.

Este processo é vantajoso porque o cromatograma não é inutilizado como no caso das reações coloridas e pode ser utilizado para outros ensáios como por exemplo testes biológicos, mas ele é muito menos sensível que as reações coloridas, com especialidade da reação de SALKOWSKI.

Quando a quantidade de auxinas cromatografadas é suficiente, elas podem ser identificadas depois de extraídas dos cromatogramas graças à forma caraterística dos cristais obtidos em presença de ácido pícrico. Para este fim o extrato do cromatograma é evaporado na superfície de uma lâmina de microscopio, aplicando-se uma gota de uma solução saturada de ácido pícrico no resíduo. A formação dos cristais pode ser acompanhada no microscopio. O AIA forma cristais caraterísticos, em agulhas de cor vermelha escura. O IAN forma finas microagulhas amarelas. Por meio do aparelho de KOFLER pode-se obter o ponto de fusão desses cristais que é de 168-169°C para o AIA e 124-126°C para o IAN.

A tabela 3 fornece os valores de Rf de diversos derivados indólicos, que obtivemos usando como solvente a agua em presença de vapores de ácido acético ou de amoniaco, ou iso-propanol com água e amoniaco nas proporções 80:15:5. A título de comparação fornecemos os Rf encontrados por FISCHER (1954) com o mesmo solvente e por STOWE e THIMANN (1954) com um solvente preparado com as mesmas substâncias em proporções diferentes (8:1:1).

O indol e escatol dão spots mal definidos de coloração fraca, sem dúvida devido à sua volatilidade, revelada, aliás, pelo seu cheiro intenso, mesmo a baixas concentrações. Por este motivo os Rf indicados para essas substâncias são duvidosos. O triptofana e o indol fornecem duas manchas o que é explicado por alguns autores no caso do triptofana como resultado da presença de duas formas da substância, uma ionizada e outra não.

TABELA 3

Valores de Rf (× 100) de diferentes derivados indólicos em cromatografia sôbre papel com diversos solventes

Substância	Agua		Iso-propanol 80:15:5	Seg. Fischer	Seg. Thimann
	vap. ac. acet.	vap. NH_3			
Acido indolacetico	65	85-88	53-57	52-55	25
Acido indolpropionico	50	—	59	—	35
Acido indolbutirico	49	—	71	—	44
Triptofana	54-63	—	45	41-43	18
Aldeido indolico	0	0	88	81-84	72
Indol	49?	—	75-80,91	—	79
Escatol	36?	—	88?	—	90
Indolacetonitrila	45	45-50	85-88	83-86	75
Indolacetato de etila	65	65-69	88	—	—

Teste biológico das auxinas

A reação colorida a mais sensível dos derivados indolicos que é a de SALKOWSKI, exige, nas melhores condições, quantidades de AIA da ordem de 1 µg. Os extratos vegetais preparados de acordo com a técnica acima descrita raramente contêm essa quantidade, motivo pelo qual na maioria dos casos é necessário revelar a presença de auxinas por meio dos testes biológicos que são muito mais sensíveis. Utilizamos unicamente o teste das secções de coleoptilas de aveia ou teste de BONNER que é sensível a concentrações de AIA de 20 a 600 µg por litro. Como o teste é geralmente praticado em um cm^3 de solução, vê-se que basta haver nessa quantidade de liquído 0,02 µg de ácido indolacetico para que o teste já forneça uma indicação. Uma descrição detalhada do teste de BONNER foi dada recentemente por um de nós (BITANCOURT 1955) pelo que somente indicaremos aqui as operações principais: Os coleoptilas são destacados de sementes de aveia da variedade Victory, cultivadas durante 3 dias em areia umida, em camara escura, com temperatura aproximada de 25°C e umidade relativa de 85%. Em seguida todas as operações são feitas à luz do laboratório o que representa uma grande vantagem sobre outros testes biologicos que devem ser efetuados a luz vermelha.

Os coleoptilas são divididos por meio de um instrumento apropriado, em secções, das quais a secção terminal, que tem aproximadamente 5 mm a partir do ápice do coleoptila, não é utilizada. As secções seguintes têm exatamente 3 mm de comprimento, sendo, em regra, somente usada a primeira, logo abaixo da secção terminal.

Cada solução a ser testada recebe dez secções de coleoptilas e depois de cerca de 18 horas as secções são medidas por meio de um microscopio munido de um micrometro-ocular, com um aumento de 20 diametros. Os resultados se exprimem em regra por porcentagem de alongamento, de acordo com a formula.

$$100\ (l\text{-}3)\ /3$$

onde l representa o comprimento final medio expresso em milimetros, das secções de coleoptilas. Por exemplo se este comprimento fôr 3,25 mm, a percentagem de alongamento será

$$100\ (3{,}25\text{-}3{,}00)/3 = 8{,}3\%$$

Cromatografia dos extratos vegetais

A quantidade de auxinas livres contidas nos tecidos vegetais é extremamente baixa, da ordem de 10 μg por quilo de tecido fresco. Juntamente com as auxinas o éter empregado na extração retira dos tecidos quantidades apreciáveis de diversas substâncias, principalmente do grupo dos corpos graxos, que constituem uma parte considerável do extrato. Num "spot" de 4 a 6 mm de diâmetro, — igual ao que se coloca no início de um cromatograma para a cromatografia dos derivados indolicos, — a quantidade de auxina presente no caso do extrato etereo, seria extremamente fraca e insuficiente mesmo para testes biologicos muito sensíveis. Para aumentar a quantidade de auxina cromatografada, distribuimos a totalidade do extrato ao longo de uma linha paralela às beiras do cromatograma, de acordo com a seguinte tecnica: Emprega-se uma folha de papel Whatman n.º 1, de 20 × 17 cm, onde, no sentido da largura, foi traçada a lápis uma linha paralela aos lados menores do retangulo e situada a 7 cm da base do papel. Esta base é o lado do retângulo que deverá ser imerso no solvente. Traça-se em seguida uma segunda linha, paralela à primeira e a 10 cm desta última. Com uma pipeta de extremidade capilar muito fina e que contem o extrato etereo reduzido por evaporação a mais ou menos 0,1 cm^3, molha-se o papel ao longo da primeira linha, evitando-se que a superfície molhada dos dois lados da linha tenha largura superior a 0,5 cm. Procura-se molhar o papel da maneira mais uniforme possível, o que se consegue deslocando a ponta capilar da pipeta de um modo regular, e com velocidade apropriada. Quanto maior a velocidade, mais estreita a faixa molhada, quanto menor, mais larga essa faixa. Repete-se a operação tantas vezes quanto necessário até esvaziamento completo da pipeta.

A identificação das auxinas nos cromatogramas é feita pela posição que elas ocupam no cromatograma, em comparação com a posição de "spots" de auxinas sinteticas colocadas na mesma folha de papel e portanto cromatografadas junto com o extrato. No decorrer do nosso trabalho adotamos diversas disposições na colocação das auxinas sinteticas. Ultimamente temos realizado todos os nossos cromatogramas com a seguinte disposição: Sôbre a mesma linha em que foi distribuido o extrato e a 0,5 cm de intervalo a partir da margem direita da folha, colocam-se 3 "spots" de 2 mm^3 de soluções de AIA à concentração de 10^{-3}, IAN a 10^{-2} e IAE à mesma concentração. As tres substâncias sintéticas são colocadas por cima do extrato de tecido, depois de sêco, pois êste ocupa toda a largura do cromatograma.

A folha de papel filtro é secada e enrolada sobre si mesma, no sentido longitudinal, na forma de um cilindro cujas beiras são reunidas na parte superior por uma tira de fita adesiva. Emprega-se para a cromatografia o recipiente utilizado na cromatografia das auxinas sintéticas (BITANCOURT 1955). A folha de papel mergulha num pequeno cristalisador que contem o solvente e no caso de se usar vapores de ácido acético ou de amoniaco para saturar o ambiente, o cristalisador é colocado dentro de outro um pouco maior, o qual contem soluções dessas substâncias a 10%. A parte superior do cilindro é fixada por um grampo à haste de vidro do dispositivo. O todo é então colocado no cilindro de vidro, munido de duas tiras de papel filtro molhadas com o solvente e destinadas a saturar o ambiente com os vapores deste último.

A cromatografia é feita por ascenção, o solvente subindo por capilaridade no papel filtro. Sendo a agua usada como solvente, a cromatografia dura aproximadamente uma hora, tempo necessário para a frente líquida percorrer a distância entre a linha ao longo da qual foi distribuido o extrato e a linha superior do cromatograma a 10 cm de distância da primeira. Com isopropanol a ascenção é muito mais lenta, durando a cromatografia aproximadamente 3 horas.

Feita a cromatografia, o cromatograma é secado e cortado longitudinalmente em duas tiras, uma delas, com 2 cm de largura, na margem direita do cromatograma, contem os 3 spots de auxinas sintéticas. Ela é submetida à reação de SALKOWSKI e mostra em um minuto, após ligeiro aquecimento, os tres spots coloridos característicos de AIA, IAN e IAE.

A segunda tira, que tem 5 cm de largura, destina-se ao teste dos coleoptilas. A parte util do cromatograma, — ou seja a que se

acha entre a linha onde o extrato foi aplicado e a linha terminal, alcançada pela frente do solvente no fim da cromatografia, — é dividida em 10 bandas paralelas de largura igual a 1/10 do intervalo entre as duas linhas. A primeira banda, que interessa a faixa onde foi distribuido o extrato, é um pouco mais larga pois, para que contenha as substâncias que não se tiverem deslocado durante a cromatografia, ela tambem compreende 0,5 cm abaixo da linha de partida. As 9 outras bandas medem aproximadamente 1 cm de largura, pois procura-se sempre parar a cromatografia quando a frente do solvente alcança a linha terminal, a 10 cm da linha de partida.

As dez bandas do cromatograma podem ser extraidas com éter que é depois evaporado, sendo o resíduo retomado com 1 cm^3 de água onde são colocados 10 cilindros de coleoptilas para o teste. Pode-se tambem extrair as bandas com água ou colocá-las diretamente em 1 ou 2 cm^3 d'água, onde se pratica o teste.

No dia seguinte é feita a leitura dos resultados, medindo-se o comprimento dos coleoptilas com o micrometro-ocular de um microscopio com aumento de x 20.

Quando a extração das auxinas é fracionada, a cromatografia das frações A e B é feita separadamente.

Representação gráfica dos resultados

Os resultados das medições dos coleoptilas são convenientemente representados graficamente por um histograma cujas ordenadas são a percentagem de alongamento dos dez coleoptilas de cada banda ou secção do cromatograma, e as abscissas os valores de Rf. As figuras 1 a 3 representam diversos histogramas estabelecidos a partir dos resultados de testes biologicos de cromatografias de extratos de tecidos. Em todos os casos submetemos os resultados experimentais a uma análise de variância e calculamos as diferenças mínimas significativas que foram representadas em margem do histograma.

Alem disto representou-se no histograma, por 3 traços paralelos às abscissas, o alongamento dos coleoptilas em água pura e em soluções de AIA nas concentrações de 2 e 6×10^{-7}, obtidos em testes com a substância sintética, realizados simultaneamente com os testes das secções do cromatograma.

O Rf do "spot" de AIA sintético aplicado na margem de cada cromatograma é igualmente indicado no histograma em todos os casos em que êle foi obtido.

Para poder comparar um número grande de histogramas, procuramos representá-los em conjunto, de um modo mais condensado

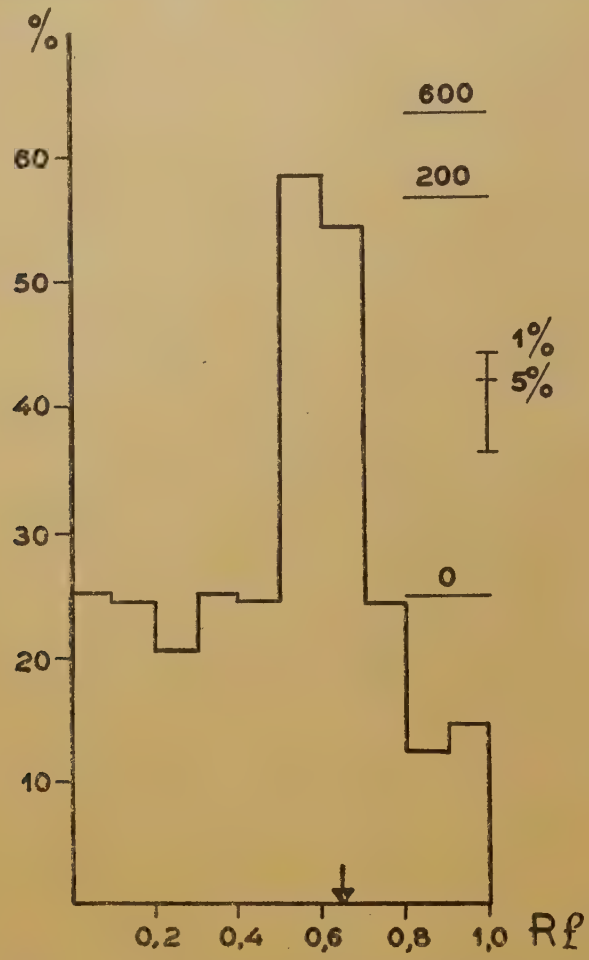


Fig. 1 — Histograma da cromatografia de um extrato de 10 gr. de endosperma de semente de milho em germinação. Em ordenadas as percentagens de alongamento de 10 segmentos de coleoptilas de aveia, colocados em 1 cm³ dágua contendo o extrato de cada uma das 10 secções do cromatograma. Em abcissas os valores de Rf. Foram representadas por três traços horizontais as percentagens de alongamento de coleoptilas colocados em água pura e em soluções de ácido indolacético sintético a 200 e 600 µg/l. Em margem do histograma foram representadas as diferenças significativos nos níveis de 5 e de 1%. A pequena seta sobre o eixo das abcissas indica a posição (Rf) do "spot" de ácido indolacetico sintético cromatografado no mesmo cromatograma.

(fig. 4 e 5). Cada cromatograma é representado por um retângulo feito de 10 quadrados justapostos, cada qual representando uma das secções do cromatograma. Os quadrados correspondentes às

secções que, pelo teste biológico, mostraram conterem auxinas em quantidade que não difere estatisticamente de pelo menos 200 µg de

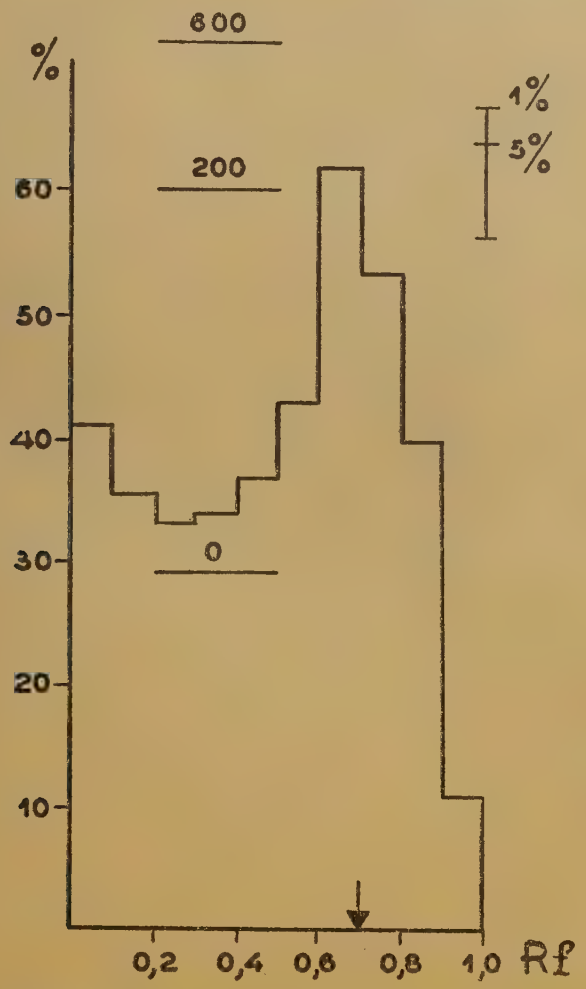


Fig. 2 — Histograma da cromatografia de um extrato de 12 gr de tecido cultivado de tumor de salgueiro. Mesmas convenções gráficas do que na figura 1.

AIA por litro, são completamente pretos. Os quadrados correspondentes a secções que apresentaram um máximo ou "modo" do histograma diferindo significativamente do resto do histograma no nível de 1% de probabilidade, são duplamente hachurados e os quadrados nas mesmas condições, para o nível de 5%, simplesmente hachurados. O resto dos quadrados foi deixado em branco.

Na maioria dos gráficos representamos com um pequeno círculo a posição, ou seja o Rf, do "spot" do AIA sintético do mesmo cromatograma. Nos cromatogramas onde a reação de SALKOWSKI

mostrou a coloração característica do AIA ou do IAN, indicamos a posição ou Rf correspondente à mancha colorida por dois traços verticais. As figuras 4 e 5 representam os gráficos obtidos de acôrdo com essas convenções.

RESULTADOS

Com as técnicas que acabam de ser descritas, foi feita a cromatografia de numerosos extratos de diversos tecidos vegetais. Sòmente daremos no presente trabalho os resultados que obtivemos empregando como solvente agua pura, em atmosfera saturada de vapores de ácido acético pois é esse solvente que nos deu os resultados mais constantes e que por isto usamos com maior frequência. Os resultados obtidos com amoniaco, usando agua, ou isopropanol como solvente, confirmaram em geral os obtidos com água e ácido acético.

A título de exemplo reproduzimos nas figuras 1 a 3 os histogramas representativos da cromatografia de alguns extratos vegetais. A figura 1 é o histograma correspondente à cromatografia de um extrato de 10 g de endosperma de sementes de milho em início de germinação. Cada secção do cromatograma foi extraída com 1 cm^3 de agua destilada, em banho-maria, durante 15 minutos. O histograma apresenta um "modo" acentuado correspondente às secções do cromatograma de Rf medio 0,55 e 0,65. Este modo representa um alongamento dos coleoptilas que não difere significativamente do da solução de AIA sintético na concentração de 200 µg/l. No mesmo cromatograma, o "spot" de AIA sintético teve um Rf de 0,65, conforme se vê pela flecha indicando o ponto correspondente do eixo das abcissas. Como o IAE tem um Rf quase igual nestas condições experimentais, deve-se concluir que o modo do histograma indica a presença no extrato de milho do AIA, do IAE, ou das duas substanciais ao mesmo tempo.

A figura 2 é o histograma da cromatografia de um extrato de 12 g de tecido cultivado de tumor de salgueiro, realizada em condições idênticas ao exemplo anterior. Ainda aqui se nota o modo correspondente ao AIA e ao IAE que indica uma quantidade dessas auxinas correspondente à de uma solução contendo 200 µg/l de AIA. O histograma ainda mostra a presença de um inibidor na ultima secção do cromatograma, da qual os coleoptilas se alongaram muito menos de que na água pura. Este inibidor, de Rf médio 0,95 nas condições da experiência, é encontrado em diversos outros dos nossos cromatogramas. Ele parece estar presente, embora em quantidade menor, no extrato de milho do exemplo anterior.

Figuras - A e B

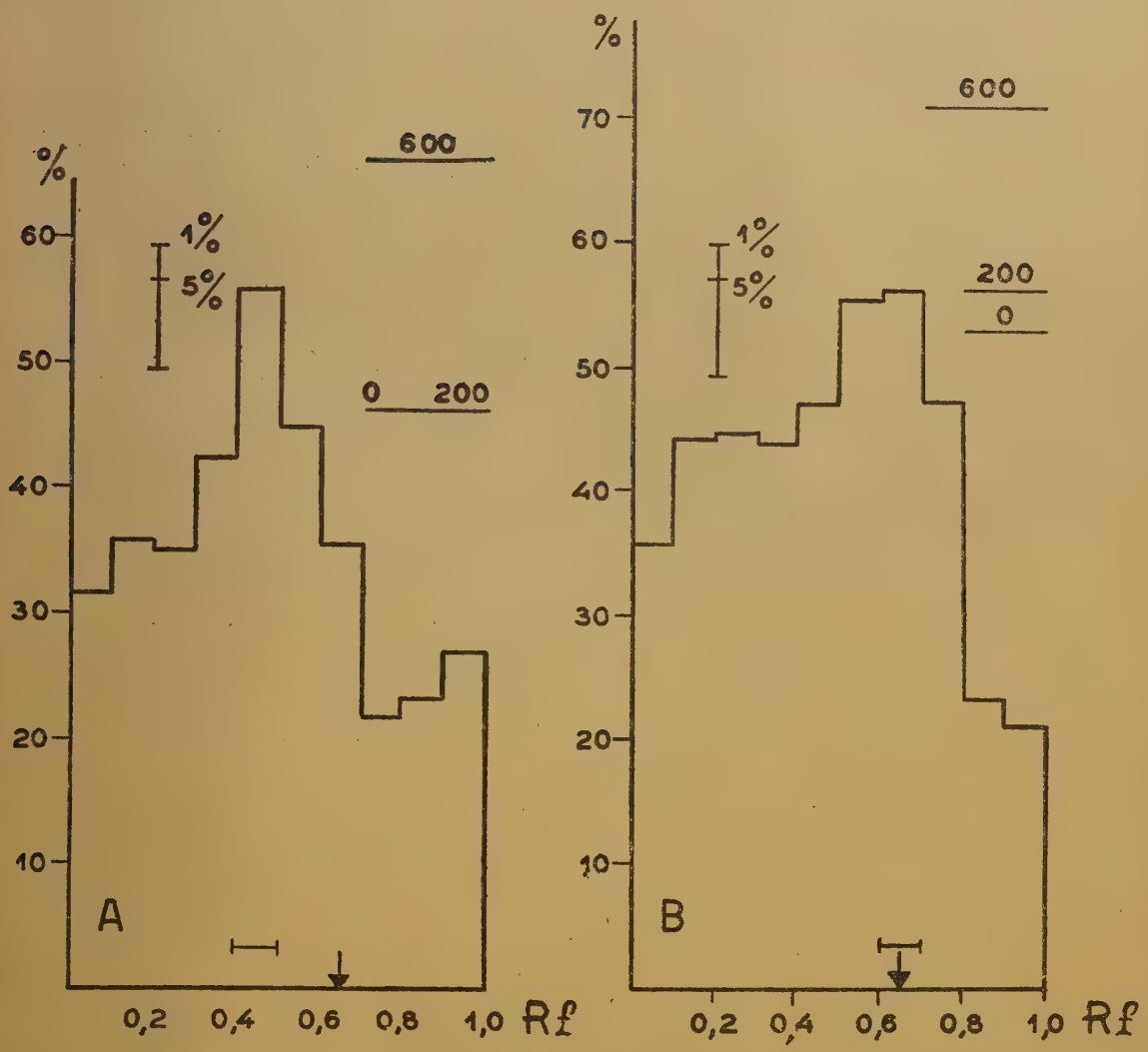
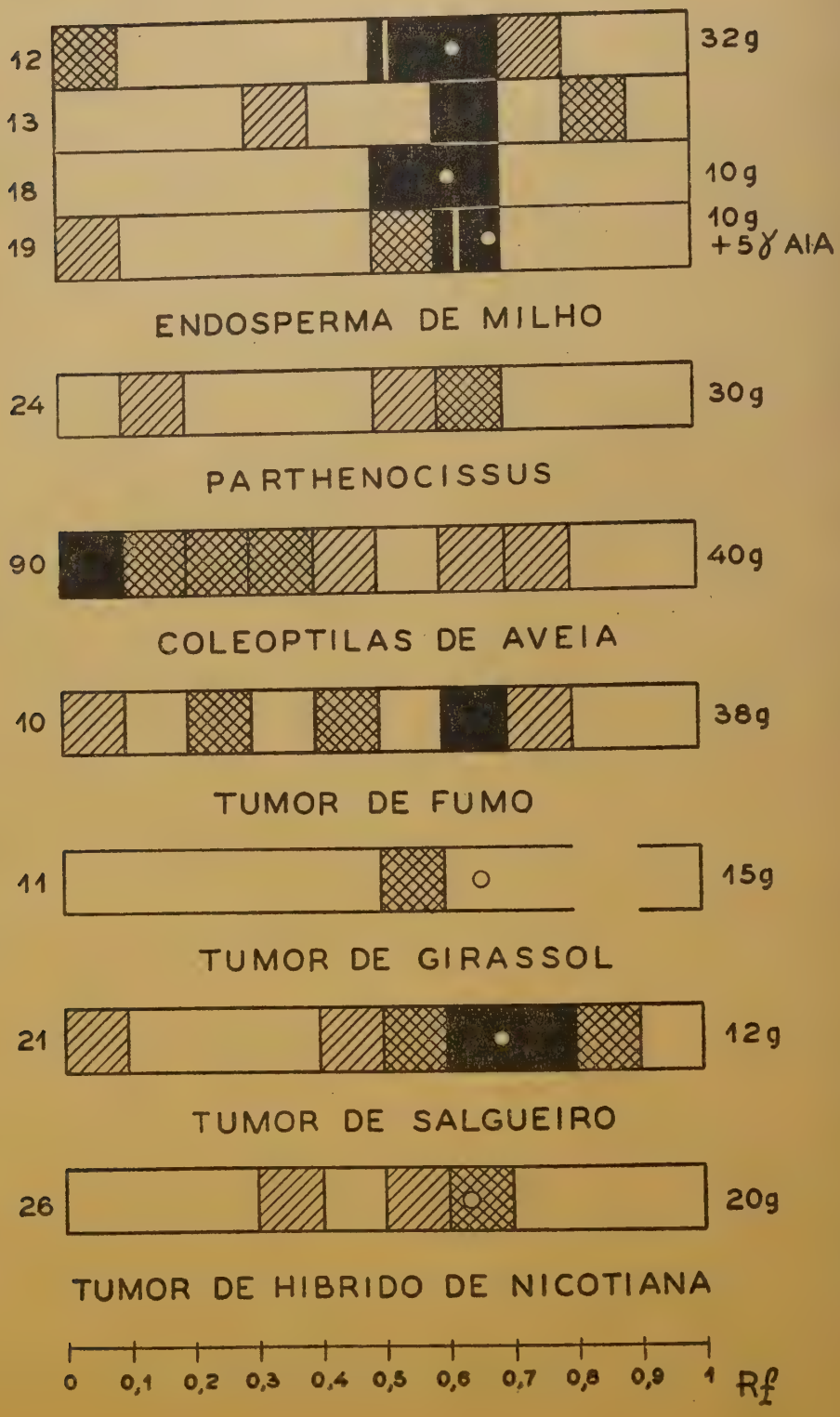


Fig. 3 — Histogramas das duas frações, A e B, de um extrato de 30 gr de tecido cultivado de tumor do híbrido *Nicotiana langsdorffii* × *N. glauca*. Mesmas convenções gráficas do que na fig. 1. Foram acrescentados 10 μg de ácido indolacético ao extrato, antes do fracionamento. Todas as secções dos cromatogramas foram retomadas com 1 cm³ de água, com exceção da secção de Rf 0,60-0,70 do cromatograma da fração B que foi retomada com 2 cm³. O pequeno traço horizontal um pouco acima do eixo das abcissas representa, no histograma A, a posição de uma mancha cor de lilaz que apareceu na parte do cromatograma submetida ao reagente de Salkowski, e que é característica do indolacetonitrila. No histograma B, a de uma mancha cor de rosa, característica do ácido indolacético.

Fig. 4

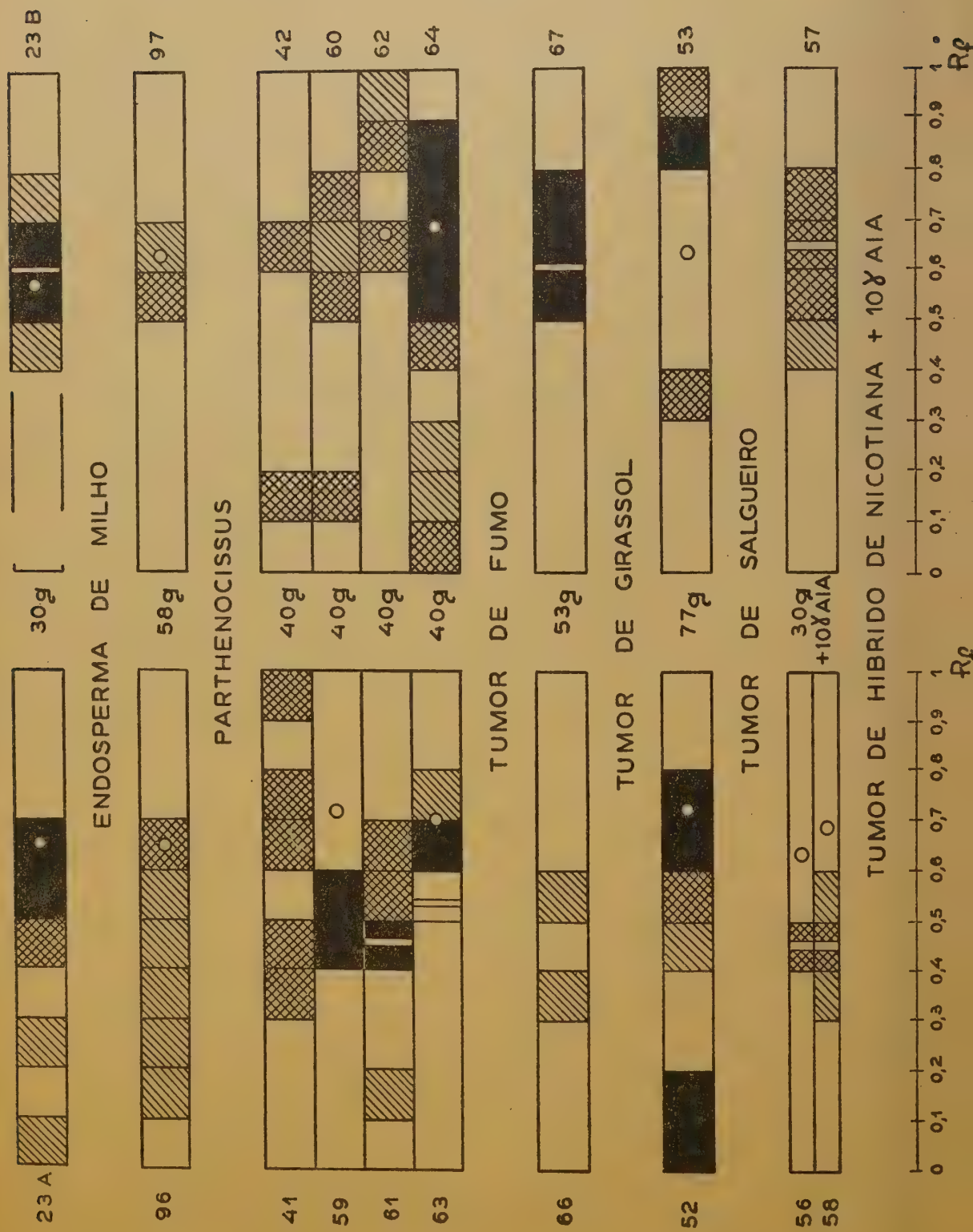

12
13
18
19
32g
10g
10g
+5γ AIA
ENDOSPERMA DE MILHO
24
30g
PARTHENOCISSUS
90
40g
COLEOPTILAS DE AVEIA
10
38g
TUMOR DE FUMO
11
15g
TUMOR DE GIRASSOL
21
12g
TUMOR DE SALGUEIRO
26
20g
TUMOR DE HIBRIDO DE NICOTIANA
0 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1
Rf

A figura 3 representa os histogramas da cromatografia das duas frações, A e B, de uma extração de 30 g de tecido cultivado de tumor do hibrido *Nicotiana langsdorffii* × *N. glauca*. A fim de verificar como se comportava o AIA durante as operações de extração, foram acrescentados ao extrato bruto, isto é, antes do fracionamento, 10 µg de AIA sintético. Os dois cromatogramas foram submetidos aos testes de coleoptilas e de SALKOWSKI. O histograma da primeira fração, que deve conter somente as auxinas neutras mostra um modo correspondente à secção do cromatograma de Rf medio 0,45. A reação de SALKOWSKI mostrou no mesmo lugar do cromatograma, uma mancha pálida de coloração lilaz, característica do IAN. Deve-se concluir que a fração neutra do extrato continha indolacetonitrilá. Nota-se que, com exceção das secções compreendidas entre os Rf 0,30 e 0,60, os coleoptilas alongaram-se menos do que na agua pura, mas como nesta última o alongamento foi tão grande quanto numa solução de AIA de 200 µg/l, não se pode afirmar que houve inibição nestas secções do cromatograma. Deve-se concluir entretanto que dos 10 µg de AIA acrescentados inicialmente ao extrato, somente uma quantidade inferior a 20 µg/l, — ou seja 0,02 µg no cm^3 testado — limiar inferior de sensibilidade do teste dos coleoptilas, pode ter permanecido na primeira fração. A figura 3 representa por uma seta o Rf correspondente ao "spot" de AIA sintético acrescentado ao cromatograma. Da mesma forma conclue-se que não havia quantidade apreciável de IAE no extrato.

O histograma da segunda fração apresenta um modo nas secções entre os Rf 0,50 e 0,70 e o reagente de SALKOWSKI deu uma mancha côr de rosa característica do AIA entre os Rf 0,60 e 0,70. Como foram acrescentados 10 µg de AIA ao extrato, é principalmente à substância sintética que se deve tanto o modo do histograma como a reação colorida. Houve uma destruição bastante considerável do AIA

Fig. 4 — Diagramas representativos das cromatografias de extratos de diversos tecidos. O número dos cromatogramas foi indicado à esquerda, e o peso do tecido extraído, à direita. Cada retângulo é composto de 10 quadrados, um para cada secção do cromatograma. Os quadrados pretos indicam modos do histograma com valor que não é significativamente inferior ao de uma solução de ácido indolacético a 200 µg/l. Os quadrados duplamente hachurados correspondem a modos do histograma significativamente maiores do que o resto do histograma, no nível de 1%; os quadrados simplesmente hachurados, da mesma forma, no nível de 5%. O pequeno círculo em alguns dos diagramas indica a posição do "spot" de AIA sintético cromatografado junto com o extrato. A barra vertical indica a posição de uma mancha côr de rosa, característica do AIA, que apareceu na parte do cromatograma tratada com o reagente de Salkowski. Ao extrato de endosperma de milho cromatografado sob o número 19, foram acrescentados 5 µg de ácido indolacético sintético. A interrupção no diagrama 11, de tumor de girassol, corresponde a uma secção do cromatograma que não foi submetida ao teste dos coleoptilas.

Fig. 5


23 A
23 B
30g
ENDOSPERMA DE MILHO
96
97
58g
PARTHENOCISSUS
41
59
61
63
42
60
62
64
40g
40g
40g
40g
TUMOR DE FUMO
66
67
53g
TUMOR DE GIRASSOL
52
53
77g
TUMOR DE SALGUEIRO
56
58
57
30g
+10γAIA
TUMOR DE HIBRIDO DE NICOTIANA + 10γ AIA
0 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1
Rf

durante as operações de extração, fracionamento e cromatografia, pois levando em consideração o fato de que a secção de Rf medio 0,65 foi extraída com 2 cc de água e a de Rf medio 0,55 com 1 cc, e admitindo que o modo indica a presença de AIA na solução testada numa concentração de 200 µg/l, as duas secções continham no máximo 0,6 µg de AIA.

Como no caso anterior nota-se que fóra das secções correspondentes ao modo, o alongamento dos coleoptilas foi significativamente inferior ao dos que estiveram em água pura. Como, no caso presente, não houve diferença significativa entre a agua pura e a solução de AIA sintético a 200 µg/l, não se pode afirmar que houve, em todas essas secções, um inibidor do alongamento dos coleoptilas, salvo nas duas últimas que apresentam um alongamento que difere do da água pura de um modo altamente significativo. Isto corresponde sem dúvida ao inibidor que vimos acima no caso do salgueiro e que deve ser uma substância de natureza ácida.

As figuras 4 e 5 representam, com as convenções gráficas explicadas no capítulo anterior, os cromatogramas obtidos com os diversos tecidos. Em particular os quatro cromatogramas cujos histogramas foram apresentados nas figuras 1 a 3 estão representados sob os números 18, 21, 56 e 57, respectivamente.

A figura 4 representa os cromatogramas feitos com extratos simples e a figura 5 os que foram feitos com extratos fracionados, a fração A no lado esquerdo e a fração B no lado direito. Conforme já dissemos, foi, em todos os casos representados, utilisada a agua como solvente, em atmosfera saturada de vapores de ácido acético, o que torna os diversos cromatogramas comparáveis entre si. Examinando-se em conjunto a figura 4, vê-se que há um modo acentuado (quadrados pretos) correspondente ao Rf do AIA e do AIE nos cromatogramas de endosperma de milho, tumor de fumo e tumor de salgueiro, e menos acentuado, porem nítido, (quadrados duplamente hachurados) no caso do tecido normal de *Parthenocissus* e do tumor do hibrido de *Nicotiana*. O histograma do extrato de coleoptilas de aveia tambem apresenta um modo (quadrado com hachuras

---

Fig. 5 — Diagramas representativos das cromatografias das duas frações, A (à esquerda) e B (à direita) de extratos de diversos tecidos. Mesmas convenções gráficas do que na fig. 4. A barra vertical em alguns diagramas do lado esquerdo indica a posição de uma mancha cor de lilaz, característica do IAN, que apareceu na parte do cromatograma tratada com o reagente do Salkowsky. No lado direito a barra vertical indica a posição de uma mancha cor de rosa, característica do AIA, obtida nas mesmas condições.. Os diagramas 56 e 58 representam duas cromatografias do mesmo extrato. As partes interrompidas do diagrama 23 B correspondem a secções do cromatograma que não foram submetidas ao teste dos coleoptilas.

simples) na mesma região do cromatograma. A presença de AIA em concentração bastante elevada nos extratos de milho acha-se confirmada no caso do cromatograma 12 pela mancha côr de rosa que o reagente de SALKOWSKI produziu no Rf 0,53. No caso do cromatograma 19 tinham sido acrescentados ao extrato 5 μg de AIA sintético, pelo que, neste caso, tanto o modo do histograma como a reação de SALKOWSKI, devem em grande parte ser devidos a este acréscimo.

No caso do cromatograma 11, do tumor de girassol, há um modo não muito nítido cujo Rf médio é 0,55, ao passo que o do AIA sintético no mesmo cromatograma foi de 0,66. E' possível, entretanto, que êsse modo corresponda ao AIA, retardado pela presença de certas substâncias do extrato.

Diversos cromatogramas apresentam outros modos que indicam a presença nos extratos de auxinas outras que o AIA. O mais frequente é o de Rf 0,05, que se vê em dois dos cromatogramas do endosperma do milho, no de tumor de fumo e no de tumor de salgueiro. E' provavelmente essa auxina, que não podemos determinar, que causou o modo muito acentuado, observado no caso dos coleoptilas de aveia, o qual se estende às secções vizinhas do cromatograma. Entre os outros modos somente merecem destaque os de Rf 0,35, dos cromatogramas de tumor de híbrido de *Nicotiana* e 0,45 do tumor de fumo. Estes modos devem corresponder ao IAN que encontramos nos cromatogramas dos extratos fracionados desses tecidos, conforme veremos adiante.

Os cromatogramas da figura 5 confirmam os da figura 4 quanto à presença do AIA e do IAE nos extratos de endosperma de milho, tumor de fumo, tumor de salgueiro e tecido normal de *Parthenocissus,* pois ha um modo correspondente a essas substâncias tanto nos cromatogramas da fração A (lado esquerdo da figura) que deve conter o IAE, como nos da fração B que contêm o AIA (lado direito da figura). No caso do tumor do híbrido de *Nicotiana* o modo somente aparece na fração B e indica a presença de AIA mas não de IAE. Neste caso, conforme mencionamos em relação aos histogramas da figura 3, é ao AIA sintético acrescentado ao extrato que se deve o modo correspondente.

A presença de AIA foi confirmada pela reação côr de rosa com o reagente de SALKOWSKI aplicada no cromatograma no caso do endosperma de milho e dos tumores de girassol e de híbrido de *Nicotiana.*

Existem outros modos em alguns dos cromatogramas da fração B, o mais notável observando-se no caso do tumor de salgueiro, nas duas secções finais do cromatograma, o qual corresponde, como os outros em Rf diferente do do AIA, a auxinas ácidas que não determinamos. Não houve indicação de presença de AIA neste cromatograma.

Na fração A dos mesmos extratos ha indicação da presença de uma auxina que produziu um modo de Rf vizinho do do AIA e do IAE, no caso do endosperma do milho, tecido normal de *Parthenocissus,* tumor de fumo (cromatogramas 41 e 63) e tumor de salgueiro. Como a fração A contem as auxinas neutras, é ao indolacetato de etila que devem ser atribuidos os modos observados. Ha indicação da presença de IAN nos cromatogramas 59 e 61 de tumor de fumo e 56 e 58 de tumor de híbrido de *Nicotiana.* Estes dois últimos foram feitos com o mesmo extrato, o n.º 58 tendo sido feito para verificação do n.º 56. A presença de IAN foi confirmada pelo aparecimento de uma mancha de cor lilaz com a reação de SALKOWSKI aplicada sobre o cromatograma no caso do cromatograma 61 de tumor de fumo e 56 e 58, de tumor de híbrido. A mesma mancha apareceu no cromatograma 63 de tumor de fumo, sem que a ela correspondesse, entretanto, um modo do histograma respetivo. Entre os modos de Rf diferente dos do IAN e do IAE, somente merece destaque, devido à sua intensidade, o das duas primeiras secções do cromatograma de tumor de salgueiro que parece confirmar o, muito menos acentuado, que se observa no caso do extrato simples do mesmo tecido (fig. 4, 21) e que corresponde por consequência a uma auxina neutra.

A presença de IAN na fração A dos extratos de tumor de fumo, indicada pelos modos correspondentes dos cromatogramas 59 e 61 e pela coloração lilás com o reagente de SALKOWSKI no cromatograma 61, foi confirmada pela obtenção dos cristais caraterísticos formados por esta substância em presença de ácido pícrico. A estampa 16 reproduz fotomicrografias dos cristais obtidos a partir do cromatograma 61 e da substância sintética.

CONCLUSÕES

Pelo método da cromatografia sobre papel, usando-se o teste biológico dos segmentos de coleoptilas de aveia (teste de BONNER), foi demonstrada a existência de ácido indolacetico ou de uma auxina possuindo o mesmo Rf nas nossas condições experimentais em extratos de endosperma de milho, tecido cultivado normal de *Partheno-*

cissus tricuspidata, e tecido cultivado de tumor de fumo, girassol, e do híbrido *Nicotiana langsdorffii* × *N. glauca.* A identificação do AIA foi confirmada pela coloração cor de rosa, característica, com o reagente de SALKOWSKI, em alguns cromatogramas de endosperma de milho e de tumor de girassol.

A presença de indolacetato de etila ou de uma auxina neutra de igual Rf, foi observada na fração A (neutra) de extratos de endosperma de milho, tecido normal de *Parthenocissus,* tumor de fumo e tumor de salgueiro.

A presença de indolacetonitrila ou de uma auxina com o mesmo Rf, foi verificada em cromatogramas de extratos simples de endosperma de milho, tumor de fumo e tumor do híbrido de *Nicotiana,* e na fração neutra do extrato fracionado de tumor de fumo e tumor do híbrido. A presença de IAN foi confirmada em alguns cromatogramas dos dois tecidos pela coloração lilás característica com o reagente de SALKOWSKI, e, no caso do fumo, pela obtenção de cristais característicos em presença de ácido pícrico.

Diversos modos, com Rf diferentes das tres substâncias acima citadas, observam-se nos histogramas correspondentes a diferentes extratos. Não sabemos a que auxinas esses modos correspondem. Pelo alto valor do modo, merece destaque o de Rf 0,05 que se verifica no caso do extrato de coleoptila de aveia e da fração neutra do extrato de tumor de salgueiro.

Em diversos cromatogramas observou-se a presença de um inibidor do alongamento dos coleoptilas de aveia, com Rf vizinho de 0,95.

STUDIES IN PLANT CANCER

I — CHEMICAL IDENTITY OF THE AUXINS OF SOME NORMAL AND TUMOR PLANT TISSUES

Abstract

The method of paper chromatography was applied for the identification of indolic auxins in several plant tissues. Ascending chromatography, with water as solvent, with vapors of acetic acid or ammonia, or a mixture of isopropanol-water-ammonia, was used for establishing the Rf values of synthetic indolacetic acid, indolacetonitrile, indolacetic acid ethyl ester, tryptophan, indolaldehyde, indole, skatole, indolpropionic and indolbutyric acids. Salkowski reagent and other color reactions were used for the development of chromatograms.

Chromatograms of the ether extracts, with or without fractionation, were prepared and developped with the Salkowski reaction or divided in ten parts which were extracted, the extract being tested for the presence of auxin by means of the Avena coleoptile cylinder test.

Indolacetic acid or an auxin with same Rf was detected with the coleoptile test in the chromatographed extracts of corn endosperm, in vitro tissue cultures of crown gall tumor tissue of tobacco, weeping willow and sunflower, tumor tissue of the hybrid Nicotiana langsdorffii × N. glauca and normal tissue of Boston ivy, Parthenocissus tricuspidata. The identity of IAA was further confirmed by the cherry red reaction with the Salkowski reagent directly on the chromatogram in the case of corn endosperm and sunflower tumor tissue. In the neutral fraction of extracts of corn endosperm, normal tissue of Boston ivy, tumor tissue of tobacco and weeping willow, the coleoptile test showed the presence of an auxin with the Rf of indolacetic acid ethyl ester.

Indolacetonitrile or an auxin with the same Rf was detected with the coleoptile test in the chromatographed extracts of corn endosperm, and tumor tissue of tobacco and of the Nicotiana hybrid. The presence of IAN in the tumor tissues was confirmed by the pale blue reaction on the chromatogram, with the Salkowski reagent, and in the case of the tobacco tumor tissue by the characteristic microcrystals obtained in the presence of picric acid.

The presence of several auxins with Rf different from that of the above mentioned substances was indicated by the coleoptile test in several instances. A very active auxin with a Rf of 0,05 was found in the extracts of Avena coleoptiles and in the neutral fraction of an extract of willow tumor tissue.

In several chromatograms an inhibitor of the growth of coleoptiles with a Rf of 0,95 was found.

BIBLIOGRAFIA

BITANCOURT, A. A. — 1955 — Recherches physiologiques sur les auxines. Paris, Libraire Genérale de l'Enseignement (Thèse Sc. Nat. 107 pp., e *Rev. Gén. Bot.* **62**: 498-594).

BITANCOURT, A. A., SCHWARZ, K. & DIERBERGER, R. — 1954 — La nature des auxines des tumeurs végétales. *C. R. Soc. Biol.* **148**: 822-825.

CAPLIN, S. M., & STEWARD, F. C. — 1948 — Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. *Science* **108**: 655-657.

FISCHER, A. — 1954 — Papierchromatographische Trennung von Indol-Derivaten. *Planta* **43**: 288-314.

GAUTHERET, R. J. — 1942 — Manuel technique de culture des tissus végétaux. Masson et Cie., Paris 172 pp.

GAUTHERET, R. J. — 1947 — Sur les besoins en hétéro-auxine des cultures de tissus de quelques végétaux. *C. R. Soc. Biol.* **141**: 627-629.

GAUTHERET, R. J. — 1948 — Action de l'acide indole-acétique sur le développement de 3 types de tissus de scorsonère: tissus normaux, tissus de crown-gall et tissus accoutumés à l'hétéro-auxine. *C. R. Soc. Biol.* **142**: 774-775.

GAUTHERET, R. J. — 1949 — Nutrition de quelques tissus végétaux normaux et pathologiques. *in* Unités biologiques douées de continuité génétique. pp. 131-136.

HENBEST, H. B., JONES, E. R. H., & SMITH, G. F. — 1953 — Isolation of a new plant growth hormone, 3-indolylacetonitrile. *J. Chem. Soc.* **776**: 3796-3801.

HENDERSON, J. H. M., & BONNER, J. — 1952 — Auxin metabolism in normal and crown gall tissue of sunflower. *Am. J. Bot.* **39**: 444-451.

JACKSON, R. W. — 1930 — A synthesis of tryptophol. *J. Biol. Chem.* **88**: 659-661.

KUEHN, H., & STEIN, O. — 1937 — Gramin-Synthese. *Chem. Berichte* **70**: 567.

KULESCHA, Z., & GAUTHERET, R. J. — 1948 — Sur l'élaboration de substances de croissance par trois types de cultures de tissus de scorsonère: cultures normales, cultures de crown-gall et cultures accoutumées à l'hétéro-auxine. *C. R. Acad. Sci.* **227**: 292-294.

LINK, G. K. K., & EGGERS, V. — 1941 — Hyperauxiny in crown gall of tomato. *Bot. Gaz.* **103**: 87-106.

MARKHAM, R., & SMITH, J. D. — 1949 — Chromatographic studies of nucleic acids. A technique for the identification and estimation of purine and pyrimidine bases, nucleosides and related substances. *Biochem. J.* **45**: 294.

OVERBEEK, J. van — 1938 — A simplified method for auxin extraction. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **42**: 42-46.

STOWE, B. B. & THIMANN, K. W. — 1954 — The paper chromatography of indole compounds and some indol-containing auxins of plant tissues. *Arch. Biochem. & Biophys.* **51**: 499-516.

WIELAND, O. P., de ROPP, R. S., & AVENER, J. — 1954 — Identity of auxin in normal urine. *Nature* **173**: 776-777.

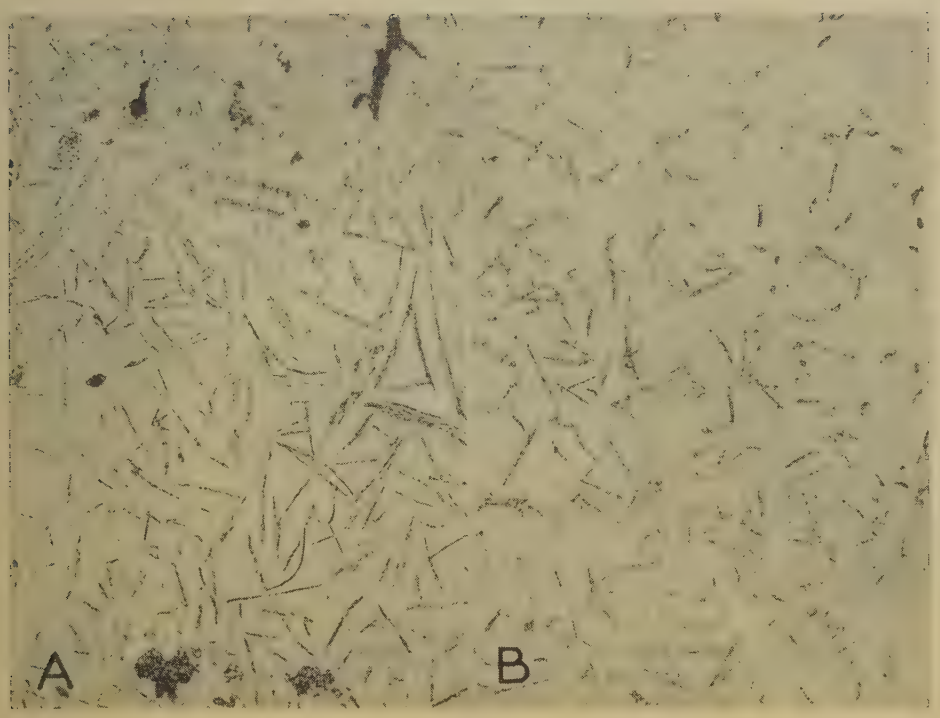
EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 16

Fig. A — Microcristais obtidos pela ação do ácido pícrico sobre o extrato de uma secção do cromatograma 61 compreendida entre os Rf 0,45 e 0,60.

Fig. B — Microcristais obtidos da mesma forma com indolacetonitrila sintético. × 200.

Figuras - A e B



Vol. 22 — Artigo 13 Dezembro de 1955

DOENÇAS DE AVES EM SÃO PAULO

ANÁLISE DE 17.753 CASOS

POR

J. Reis e P. Nóbrega

com a colaboração de

R. C. Bueno, A. S. Reis e M. Giovannoni

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com 14 figs. e 6 tabelas no texto

De 1930 a 1953, inclusive, tivemos ocasião de observar 17.753 casos de moléstias de aves e realizar 32.666 exames de aves vivas ou necrópsias a êles correspondentes. Algumas observações parciais foram objeto de publicações anteriores, mas numerosos dados novos serão incluidos neste trabalho, cujo fim principal é analisar em conjunto tôdas as verificações feitas, durante 24 anos, sôbre a incidência de moléstias de aves em S. Paulo.

Todos os exames referidos foram realizados na Seção de Ornitopatologia do Instituto Biológico ou no serviço que o precedeu, dentro da antiga Seção de Bacteriologia. A diferenciação, nessa antiga seção, de um núcleo de pesquisas ornitopatólogicas decorreu do grande número de consultas sôbre doenças de aves trazidas ao Instituto. Cedo se verificou ser muito escasso o conhecimento das doenças de aves em nosso meio, repetindo-se a miúde entre criadores, e até mesmo entre profissionais, diagnósticos errôneos, baseados exclusivamente em conhecimentos hauridos em livros estrangeiros, que na verdade não se aplicavam entre nós. Exemplo de tal situação era a freqüência com que se fazia diagnóstico de "peste aviária", contra a qual se recomendavam vacinas de nenhum interêsse, uma vez que outra era a moléstia em foco, na maioria cólera, tifo ou espiroquetose. Tornou-se necessário, pois, um trabalho sistemático de reconhecimento, identificação e classificação das doenças que grassam em nosso meio. E como natural decorrência dêsse esfôrço impôs-se um outro — o de estudar e preparar meios eficazes e específicos de defesa contra as doenças que, não há exagêro em dizê-lo, impediam completamente o desenvolvimento da avicultura em S. Paulo e, em geral, no país.

A ação do Instituto Biológico não permaneceu confinada ao trabalho de pesquisa e diagnóstico no laboratório. Estendeu-se ativamente a todo o interior do Estado, através de periódicas e freqüentes visitas aos criadores de aves, qualquer que fosse o tamanho de suas

emprêsas. Essas visitas, destinadas a colheita de material, separação de doentes, realização de provas sorológicas rápidas, como o reconhecimento dos portadores de pulorose pelo antígeno colorido, tinham, como característica dominante, uma alta função educativa, cujo resultado imediato era a natural aproximação entre os criadores e o laboratório. Dessa aproximação conseguida apenas pelo esfôrço educativo, sem quaisquer medidas coercitivas, resultou abundante afluxo de material para estudo e a possibilidade de acompanhar, nas criações e em condições naturais, o desenvolvimento das epidemias e a aplicação de medidas de defesa, que tinham de adaptar-se aos vários casos, conforme a experiência adquirida.

O trabalho educativo realizado diretamente junto dos criadores, de modo quase individual, estendeu-se, em algumas oportunidades, através de cursos e de preleções realizadas no próprio Instituto ou no interior. Nesse trabalho educativo, como aliás em tôda a orientação dada ao núcleo de estudos ornitopatológicos, obedeceu o Instituto Biológico a uma concepção nem sempre bem compreendida pelos técnicos avícolas, isto é, ao interêsse de desenvolver e amparar especialmente a pequena avicultura e não apenas as grandes emprêsas produtoras de aves e ovos, que alguns supõem ser a única fôrça ativa dentro da avicultura. Tal orientação, nascida da atenta observação da realidade de nosso meio, não se afasta da seguida noutros países, inclusive os Estados Unidos, embora a tendência, tão nossa, para o grandioso não raro perca de vista o lado mais positivo da experiência norte-americana, que é a de uma grande população avícola feita de pequenos lotes, para só focalizar as enormes e relativamente raras emprêsas.

A experiência que serviu de base à constituição e ampliação daquele núcleo ornitopatológico, que em 1934, em vista do volume de trabalho nele desenvolvido, se transformou em Seção de Ornitopatologia, foi adquirida, pois, simultâneamente no laboratório e no campo. O estudo do animal doente não se dissociou, nunca, do estudo do rebanho a que êle pertencia. A preocupação com a etiologia e a patogênese não apagou o interêsse pela epidemiologia.

Todo êsse esfôrço pôde ser registrado com precisão graças à colaboração dos serviços de desenho e fotografia do Instituto, que permitiram a organização de completo documentário ornitopatológico, de natureza iconográfica, constituido pelas coleções de desenho (atualmente 660), fotografias (atualmente 1.600) e diapositivos (atualmente 200). De apreciável parte dêsse material fizeram-se clichês para ilustração de artigos especializados ou de divulgação. Todos

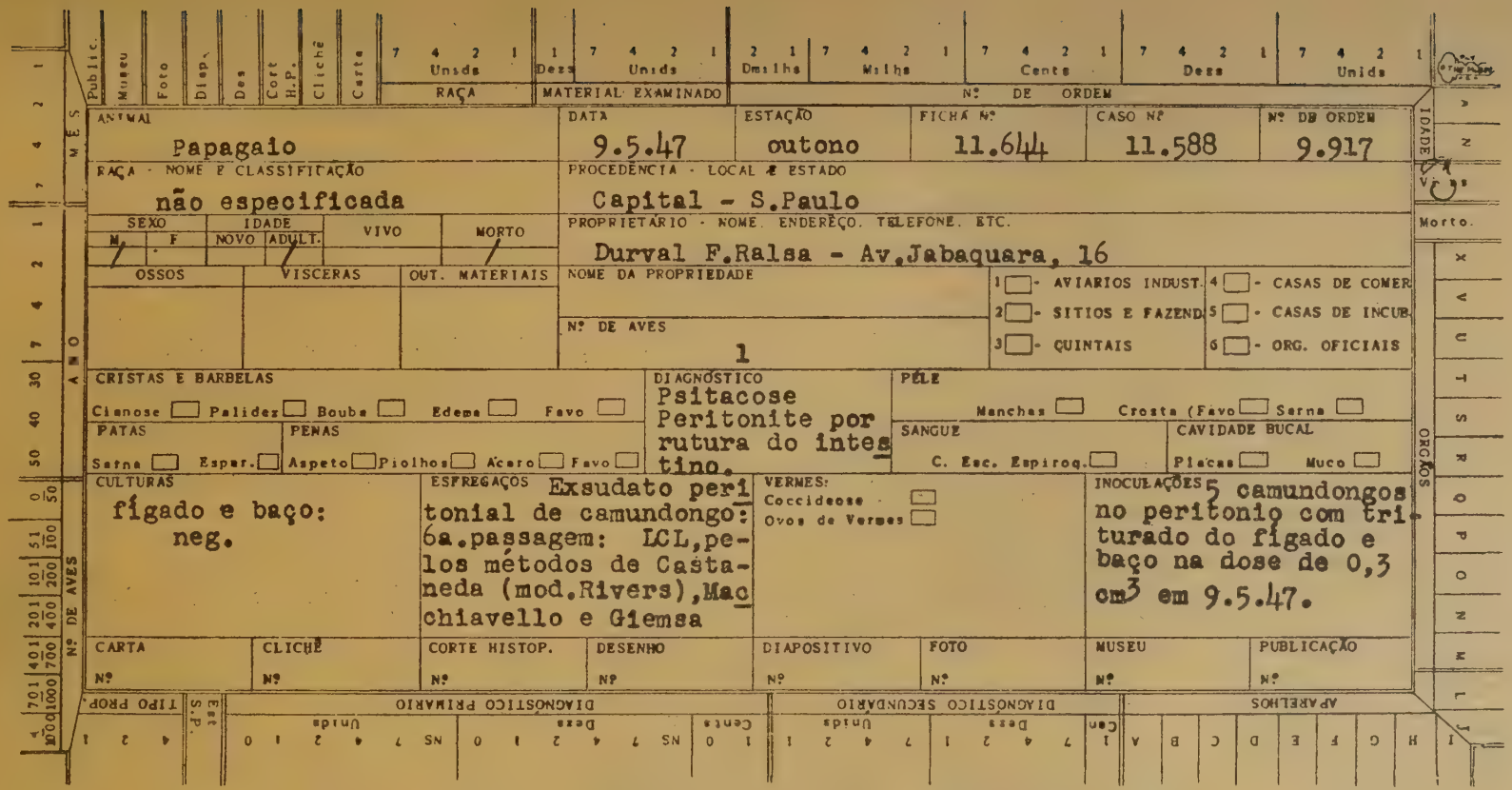


Fig. 1 — Anverso de uma ficha de exame de ave, devidamente picotada.

O animal chegou morto ao Instituto, após doença de curta duração. A autópsia apresentava processo intenso de peritonite em consequência de rutura do intestino por motivo não apurado. Órgãos internos baço e fígado bastante aumentados de volume, o último de côr marrom escura. Culturas do fígado e baço: neg.

É feito um triturado do fígado e baço do papagaio cuja emulsão em água fisiológica é inoculada na dose de 0,3 cm^2 no peritônio de 5 camundongos em 9.5.47. Em 18.5, morrem todos os camundongos, com baço bastante aumentado. 18-5 Nova passagem com emulsão de baço (0,3 cm^2) no peritônio de 3 camundongos. Morreram em 25.5 apresentando apenas aumento do baço. Culturas do fígado e baço negativas; Giemsa baço: nada vi. Sòmente a partir da 6a.passagem, apresentam os camundongos além de aumento acentuado (1=0,335 gr.) do baço, grande exsudato peritonial e pericárdico (supradiafragmático),

aspecto viscoso, côr branca-ligeiramente amarelado, e exsudato hepatico, principalmente peri-hepatico, sob a forma de um depósito branco de fibrina, mais abundante na borda do fígado.

Castañeda (mod.Rivers)- Macchiavello Giemsa	numerosos corpúsculos (respect.azuis Cast., azuis e vermelho Macch.e azuis Giemsa) principalmente em células grandes mononucleares, com numerosos vacúolos.

5 camundongos inoculados em 12.7 no cérebro (0,03) morrem em 5 dias, depois de apresentar sintomas nervosos. Até 19.7, são feitas 10 passagens, morrendo todos os camundongos na média de 7 dias (6º ao 8º em geral). Em 12.8 é feita uma determinação da D M M (met. Reed e Muench), usando-se baço de camundongo da 9a.passagem (peso 0,335 gr.) e fazendo-se diluição em água fisiológica a 1:20, 1:200, 1.2000, 1.20.000, 1.200000. A ld 50 = 0,2 cm da diluição 1:200.000

CASA OLEON LTDA. DEPTO. McBEF	INSTITUTO BIOLÓGICO - SEÇÃO DE ORNITOPATOLOGIA	SISTEMA KEYSORT MOD. IB-1-1/48

Fig. 2 — Verso da mesma ficha.

êsses elementos acham-se registrados em fichas cruzadas que permitem, a qualquer momento, reunir sem dificuldade todo o material de demonstração relativo a determinado assunto (fotografias, desenhos, diapositivos, clichês, peças de museu, fichas de necrópsia).

Afora os registros acima referidos, encontra-se na Seção de Ornitopatologia anotação, classificada por nomes e localidades, de todos os criadores atendidos e de todos os contatos que têm mantido com o Instituto Biológico. Êsse registro acusa um número global de 6.837 criadores.

Assim que adquiriu a necessária experiência sôbre as doenças mais comuns em nosso meio, a Seção de Ornitopatologia, ou o serviço que a precedeu, tratou de completar pela divulgação escrita e oral os ensinamentos destinados aos criadores. Fez-se essa divulgação através de folhetos largamente distribuidos entre os interessados, e em número de 25, bem como por meio de artigos publicados em revistas e jornais de grande circulação, num total de 158, e de numerosas preleções.

A grande colaboração dada ao Instituto Biológico pelos avicultores e o programa, nele desenvolvido, de pesquisa sistemática das doenças de aves — e pesquisa ativa, em que o laboratório se deslocou ao encontro das doenças (durante certo tempo a Seção de Ornitopatologia manteve um carro-laboratório) — ensejaram a obtenção de larga experiência em tempo relativamente curto, pois em 1936 já se tornava possível publicar, com documentação quase exclusivamente original, um tratado de ornitopatologia em que os mais abalisados críticos reconheceram verdadeira "mina de informação" como se deduz do comentário publicado no *Tropical Diseases Bulletin* (vol. 33, 8, 1936).

As observações feitas em cada exame (necrópsia ou animal vivo) são anotadas em fichas especiais, sistema Keysort, adaptadas a êsse fim particular. Tais fichas, cujo verso e anverso se acham reproduzidas nas figuras 1 e 2, permitem o rápido levantamento estatístico das informações nelas contidas.

DISTRIBUIÇÃO DE CASOS PELOS MESES DO ANO

A figura 3 mostra a distribuição dos casos recebidos para exame nos vários meses do ano, sendo de notar que o aumento observado de setembro a dezembro, com acme em outubro, está relacionado com o maior número de pintos e aves em crescimento, nesta época do ano.

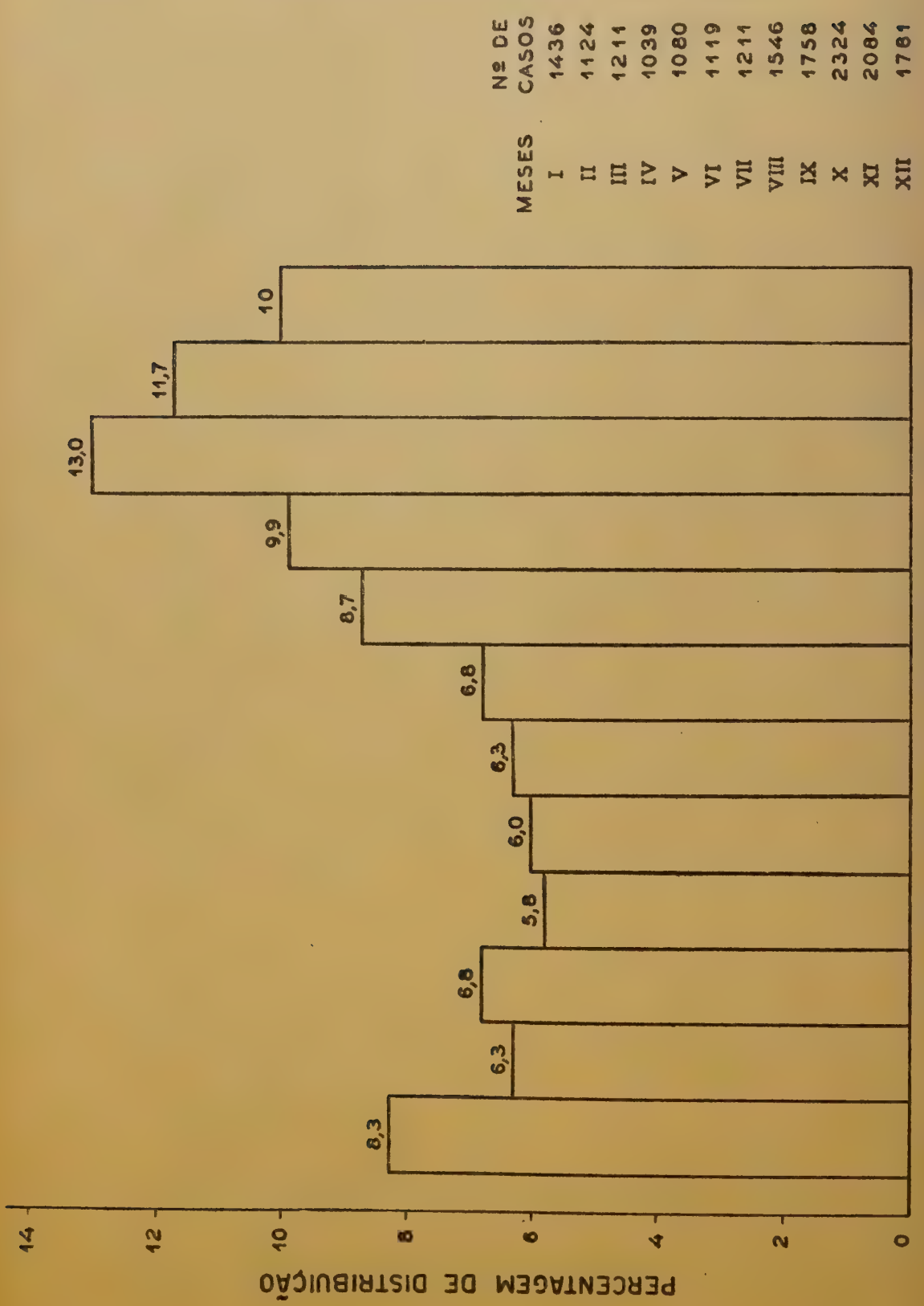


Fig. 3 — Incidência de moléstias de aves, nos diversos mêses do ano, de 1930 a 1953, do pêlo com o material recebido pelo Instituto Biológico.

INCIDÊNCIA DE MOLÉSTIAS EM VÁRIAS ESPÉCIES DE AVES

A tabela 1 resume as observações feitas em várias espécies aviárias, principalmente a galinha, que representa 88% do material enviado ao laboratório.

Os dados seguintes referem-se às espécies não consignadas nas tabelas, figurando entre parêntesis o número de casos observados de cada moléstia ou afeção de órgãos ou aparelhos:

1. *Araponga*: (*Procnias nudicollis*): bouba (1); ap. digestivo (1); sistema nervoso (1).
2. *Avinhado*: (*Oryzoborus angolensis*): *estreptococo* (1).
3. *Batuira da praia*: (*Charadrius* sp.): helmintose (1).
4. *Bico de lacre*: (*Estrilda cinerea*): aspergilose (2); isosporose (2); ap. digestivo (1).
5. *Calafate*: (*Padda oryzivora*): estafilococo (1); Hemoproteus (1); artrópodes (1).
6. *Cardeal*: (*Paroaria* sp.): bouba (1); leucose (1); helmintose (1).
7. *Codorna*: (*Nothura maculosa*): colibacilose (1); helmintose (1).
8. *Coleirinha*: (*Sporophila collaris*): bouba (1).
9. *Corta-mar*: (*Rhynchops* sp.): helmintose (1).
10. *Corrupião*: (*Xanthornus* sp.): artrópodes (1); esqueleto e ap. locomotor (1); pele (1).
11. *Coruja do campo*: (*Speotyto* sp.): helmintose (1).
12. *Ema*: (*Rhea americana*): helmintose (1); ap. digestivo (1).
13. *Gaivota*: (*Sterna* sp.): helmintose (2); artrópodes (1).
14. *Gaturamo*: (*Chlophonia cyanea*): isosporose (1); ap. respiratório (1).
15. *Guarundi*: (*Tachyphonus coronatus*): *colibacilose* (1).
16. *Jandaia*: (*Aratinga* sp.): ap. circulatório (1).
17. *Jaó*: (*Crypturellus* sp.): tricomonose (1).
18. *Juriti* (*Leptoptila* sp.): eimeriose (1); helmintose (1).
19. *Marreca d'água* (*Dendrocygna viduata*): helmintose (1).
20. *Marreca Irerê* (*Dendrocygna* sp.): helmintose (2).
21. *Martim pescador* (*Chloroceryle amazona*); helmintose (1).
22. *Melro* (*Archiplanus* sp.): gôta (1).
23. *Mutum* (*Crax* sp.): helmintose (1).

TABELA 1

INCIDÊNCIA DE MOLÉSTIAS EM VÁRIAS ESPÉCIES DE AVES

DOENÇAS DAS AVES	Angola (*Numida meleagris*)	Arara (*Ara* sp.)	Azulão (*Cyanocompsa cyanea*)	Canário (*Serinus canarius*)	Cisne (*Cygnus* sp.)	Faisão (*Phasianus* sp.)	Galinha (*Gallus gallus*)	Ganso (*Anser* sp.)	Inhambú (*Tinamus* sp.)	Macuco (*Tinamus solitarius*)	Marreco (*Anas boschas*)	Papagaio (*Amazona* sp.)	Pato (*Cairina moschata*)	Pavão (*Pavo cristatus*)	Perdiz (*Rhynchotus rufescens*)	Periquito (*Brotogeris* sp).	Peru (*Meleagris gallopavo*)	Pintassilgo (*Spinus* sp.)	Pixoxó (*Sporophila frontalis*)	Pombo (*Columba livia*)	Sabiá (*Turdus* sp.)	Outras espécies (*)	Total
Bouba	—	—	—	46	—	1	366	—	—	—	1	1	—	—	—	—	39	1	—	2	—	4	461
Complexo leucótico	1	—	—	1	—	1	1394	2	—	1	—	—	8	—	—	—	7	—	—	1	—	1	1417
Tumores	—	—	—	—	—	—	188	1	—	—	1	—	1	—	—	1	—	—	—	—	—	1	193
Psitacose e Ornitose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	2
Sinusite	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	26	—	—	—	—	—	26
Espiroquetose	—	—	—	—	—	—	1116	7	—	—	5	—	22	—	—	—	4	—	—	—	—	—	1154
Inf. por Estafilocos	—	—	—	10	—	—	67	—	—	—	2	—	2	—	—	—	—	—	—	4	1	1	87
Inf. por Estreptocos	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	2
Inf. por Pseudomonas	—	—	—	2	—	2	25	—	—	—	—	—	1	—	—	—	3	—	—	—	—	1	34
Inf. por Alcalígenes	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
Salmoneloses (excl. pul. e tifo)	1	—	1	22	—	—	4	—	1	—	1	5	4	—	—	—	—	1	1	13	—	2	56
Pulorose	—	—	—	—	—	—	762	—	—	—	—	—	3	—	—	—	4	—	—	—	—	1	770
Tifo	—	—	—	—	—	—	319	1	—	1	—	—	—	—	—	—	4	—	—	—	—	—	325
Colibacilose	—	—	1	7	—	—	70	—	1	—	2	1	3	—	—	—	2	3	—	1	—	2	93
Cólera	6	1	—	—	—	1	813	20	—	—	20	1	162	—	—	1	29	—	—	6	—	—	1060
Inf. por B. arthropyogenes	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Coriza	—	—	1	2	—	3	987	1	—	—	1	7	6	—	1	1	7	—	—	6	—	1	1024
Tuberculose	1	—	—	—	2	1	26	—	—	—	5	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	37
Botulismo	—	—	—	—	—	—	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5
Moniliose	—	—	—	—	—	—	3	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	5
Favo	—	—	—	—	—	—	18	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	18
Mucormicose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Aspergilose	—	—	—	4	—	—	36	—	—	3	—	1	4	—	—	—	2	—	1	1	—	5	57
Flagelose (**)	—	—	—	—	—	—	10	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11
Tricomonose	1	—	—	—	—	—	73	1	—	—	—	—	6	—	—	—	6	—	—	18	—	1	106
Enterepatite	1	—	—	—	—	1	204	—	—	—	—	—	—	17	—	—	195	—	—	—	—	—	418
Total parcial	11	1	3	94	2	10	6489	33	2	5	39	21	222	17	1	3	329	5	2	54	1	21	7365

(*) Veja referência no texto.

(**) Acham-se aqui reunidos os casos de intensa proliferação de flagelados, em geral, no tubo digestivo, sem todavia se entender sejam eles causa da moléstia.

TABELA 1 (Continuação)

INCIDÊNCIA DE MOLÉSTIAS EM VÁRIAS ESPÉCIES DE AVES

DOENÇAS DAS AVES	Angola (*Numida meleagris*)	Arara (*Ara* sp.)	Azulão (*Cyanocompsa cyanea*)	Canário (*Serinus canarius*)	Cisne (*Cygnus* sp.)	Faisão (*Phasianus* sp.)	Galinha (*Gallus gallus*)	Ganso (*Anser* sp.)	Inhambú (*Tinamus* sp.)	Macuco (*Tinamus solitarius*)	Marreco (*Anas boschas*)	Papagaio (*Amazona* sp.)	Pato (*Cairina moschata*)	Pavão (*Pavo cristatus*)	Perdiz (*Rhynchotus rufescens*)	Periquito (*Brotogeris* sp).	Peru (*Meleagris gallopavo*)	Pintassilgo (*Spinus* sp.)	Pixoxó (*Sporophila frontalis*)	Pombo (*Columba livia*)	Sabiá (*Turdus* sp.)	Outras espécies (*)	Total
Sarcosporidiose	—	—	—	—	—	—	6	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	9
Toxoplasmose	—	—	—	3	—	—	1	—	—	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	51	—	—	58
Eimeriose	50	—	—	—	—	5	2719	—	—	2	4	1	8	7	6	—	62	—	—	23	—	1	2888
Isosporose	—	—	—	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	19	2	—	1	11	48
Malária	—	—	—	17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	17
Hemogregarinas	—	—	—	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4
Ciliados	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
Hemoproteose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12	—	1	13
Helmintose	73	—	—	1	—	9	1988	1	1	—	4	1	15	5	3	—	27	—	1	90	3	21	2243
Artrópodes parasitas	—	—	—	23	—	4	277	—	—	1	—	—	—	1	2	1	3	—	—	4	2	4	322
Raquitismo	—	—	—	—	—	1	150	1	—	—	1	—	1	—	—	—	28	—	—	3	—	—	185
Perose	—	—	—	—	—	2	17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	20
Avitaminose A	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
Gôta	3	1	—	9	—	2	852	3	—	—	2	—	13	—	3	1	21	—	—	4	—	2	916
Ap. digestivo	5	—	2	18	1	2	689	7	—	2	14	5	26	2	8	6	20	—	—	15	1	4	827
Ap. respiratório	2	2	—	13	—	7	736	1	2	—	13	14	7	1	1	3	19	—	—	11	—	3	835
Ap. circulatório	—	1	—	4	—	1	87	—	—	—	5	3	4	—	—	—	2	—	—	1	—	3	111
Esqueleto e Ap. locomotor	—	—	—	—	—	1	71	—	—	—	—	—	—	—	—	1	6	—	—	1	—	1	81
Ap. urinário	—	—	—	—	—	—	40	—	—	—	2	—	1	1	—	—	2	—	—	—	—	1	47
Ap. reprodutor	—	1	—	1	1	4	814	1	1	3	3	—	8	—	1	—	9	—	—	1	—	—	848
Péle, fâneros e tec. conj.	—	—	—	3	—	1	148	—	—	—	—	1	1	—	—	—	4	1	—	—	—	1	160
Sistema nervoso	—	—	—	—	—	—	73	—	—	—	—	1	10	—	2	1	1	—	—	3	—	1	92
órgãos dos sentidos	—	—	—	1	—	—	16	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1	—	—	1	—	1	21
Vícios	—	—	—	—	—	—	28	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	28
Envenenamentos	—	—	—	4	—	—	29	—	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	4	—	2	41
Patol. do Desenvolvimento	—	—	—	—	—	—	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	6
Não identificadas	2	3	—	44	—	15	212	1	2	—	31	27	61	2	1	6	24	3	—	31	—	—	565
Total geral	146	9	5	254	4	64	15549	48	9	13	122	74	379	36	28	22	560	28	5	310	8	79	17753

(*) Veja referência no texto.

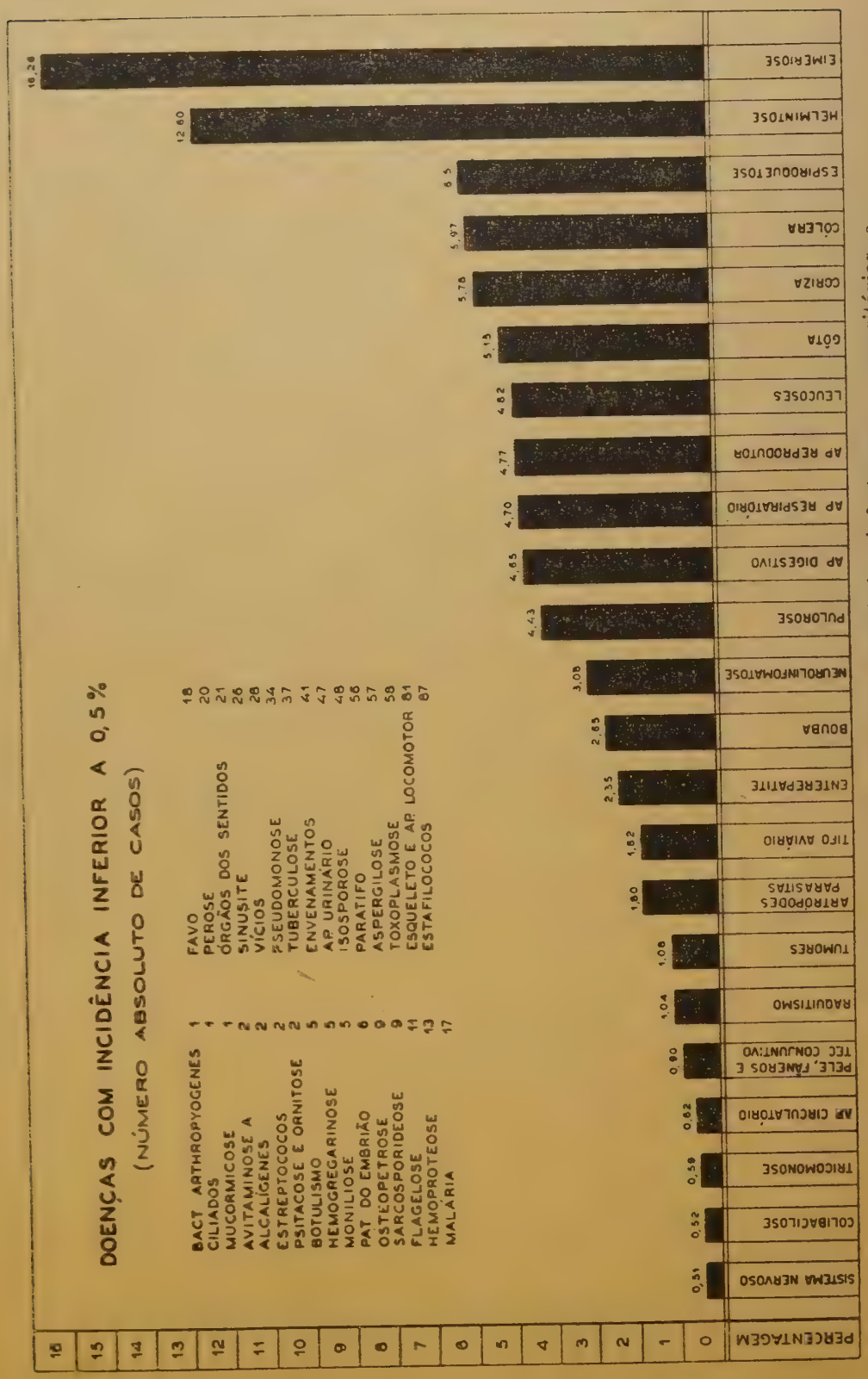


Fig. 4 — Freqüência comparada de várias moléstias infectuosas e parasitárias e afecções de órgãos e aparelhos, que atacam aves em São Paulo, de acôrdo com os 17.753 casos enviados ao Instituto Biológico de São Paulo, no período de 1930 a 1953.

24. *Narcejão* (*Capella* sp.): helmintose (1).
25. *Papa-capim* (*Sporophila falcirostris*): salmonelose (1).
26. *Pardal* (*Passer domesticus*): isosporose (3); helmintose (1); artrópodes (1).
27. *Pássaro não identificado*: isosporose (2); gôta (1); ap. respiratório (2); ap. circulatório (2); órgãos dos sentidos (1).
28. *Patativa* (*Sporophila plumbea*): isosporose (2).
29. *Pinto d'água* (*Laterallus exilis*): helmintose (2).
30. *Rolinha* (*Columbigallina* sp.): ap. urinário (1); envenenamento (2).
31. *Saíra* (*Tangara seledon*): bouba (1); salmonelose (1).
32. *Tico-tico* (*Zonotrichia capensis*): aspergilose (1); isosporose (1).
33. *Tucano* (*Ramphastos* sp.): tumor (1); sarcosporidiose (1); helmintose (1); ap. digestivo (1).
34. *Uru* (*Odontophora* sp.): helmintose (2).
35. *Vira* (*Molothrus bonariensis*): pseudomonose (1); coriza (1); aspergilose (2).

A figura 4 mostra a freqüência comparada das várias moléstias de aves verificadas em São Paulo. Quanto às doenças com incidência inferior a 0,5%, indicamos no gráfico o número absoluto de casos observados.

A — DOENÇAS PRODUZIDAS POR VIRUS

1. BOUBA

Observamos 461 casos (2,65%), distribuídas pelas seguintes espécies: galinhas (366); canário (46); peru (39); pombo (2) e araponga, cardeal, coleirinha, faisão, marreco, papagaio, pintassilgo e saíra (um de cada).

Predomina a forma cutânea, mas encontramos 29 formas diftéricas, associadas ou não a lesões cutâneas, assim distribuídas: galinha (25), perus (3) e pombo (1).

A figura 5 representa a distribuição da bouba pelos diferentes meses do ano e a figura 6 reproduzida mais adiante, mostra a incidência da moléstia nos anos de 1931 a 1953.

Casos interessantes de Bouba

1. *Forma respiratória em canários* ("*Schnappkrankheit*")

Observamos 4 casos. No primeiro dêles, o canário apresenta dispnéia e arrepiamento e abre a bôca continuamente, como a tomar fôlego, ouvindo-se uma espécie de guincho, que se acentua quando o

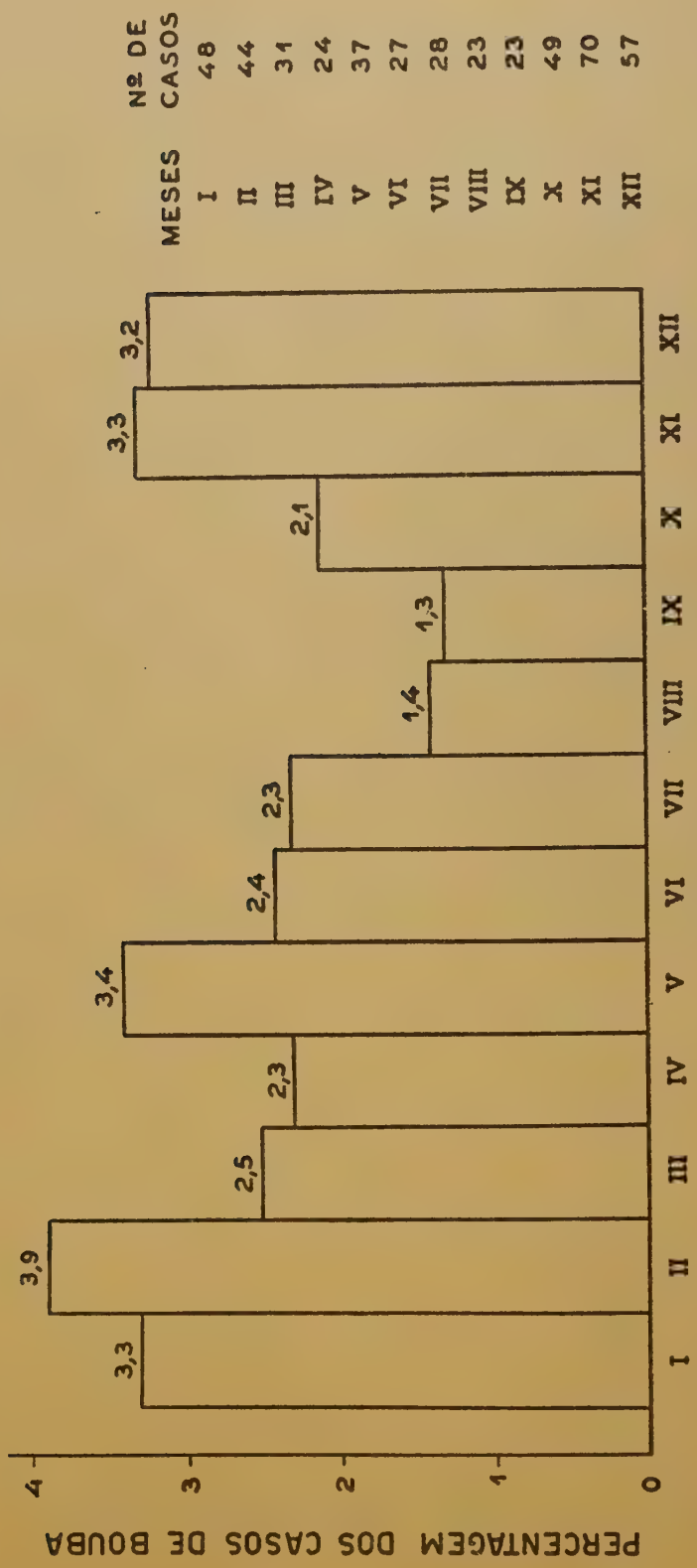


Fig. 5 — Freqüência relativa de bouba, nos diferentes mêses do ano, de 1930 a 1953.

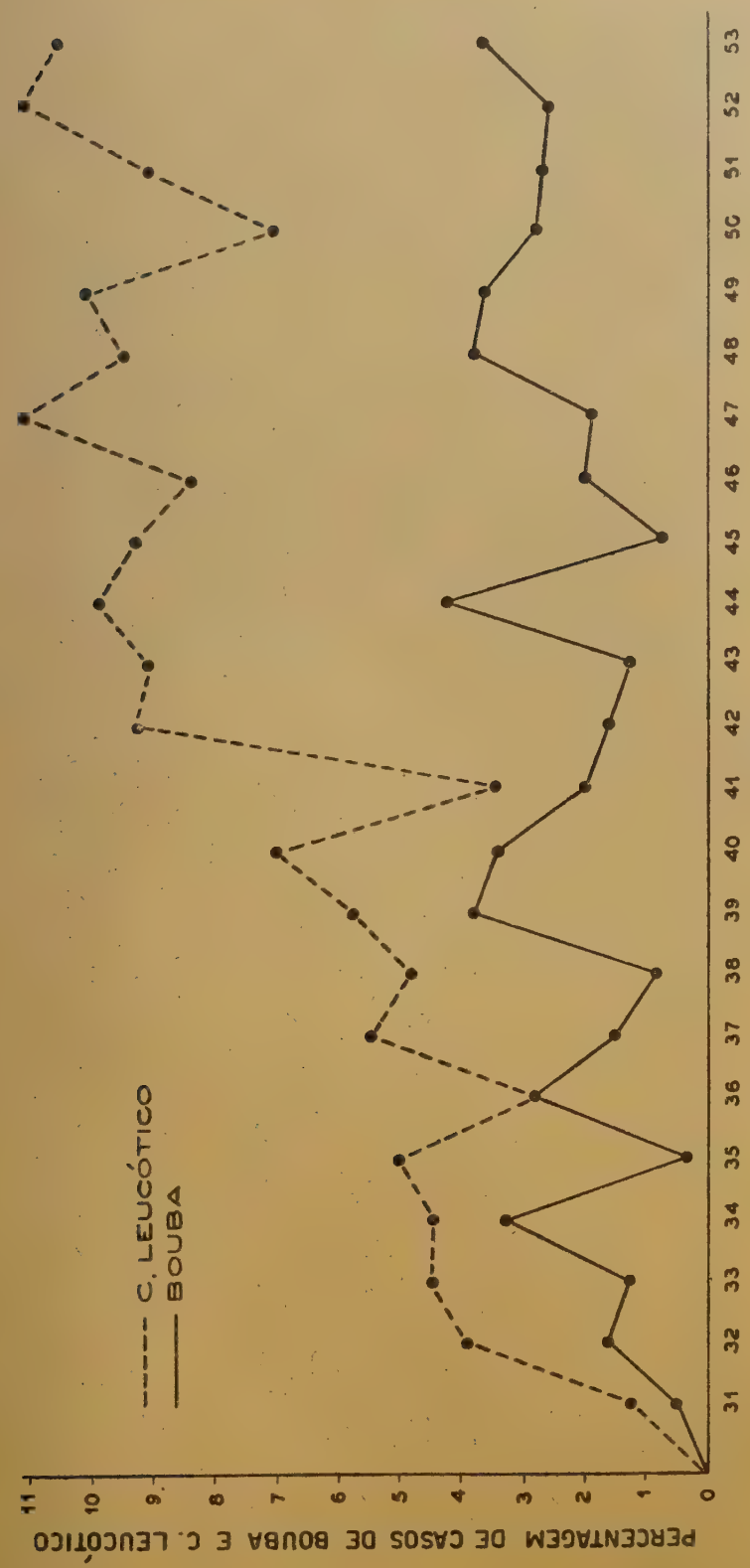


Fig. 6 — Freqüência relativa de bouba e complexo leucótico dentre os 17.753 casos enviados ao Instituto Biológico de 1931 a 1953.

animal se movimenta. Não há sináis externos de bouba ou difteria. Lesões à necrópsia: nódulos caseosos no pulmão; exsudato fibrinoso sôbre o fígado e membranas dos sacos aéreos; glândulas do uropígio inflamadas. Com o material do pulmão produziram-se lesões de bouba na pele de canário.

Em dois outros casos, os canários apresentam saco aéreo espessado e exsudato amarelo, que se encontra também na face interna do peitilho esterno-costal; pulmão esquerdo congestionado, com pequeno nódulo na base, junto da parede do saco aéreo; baço aumentado; exsudato traqueal. Com o material do nariz e traquéia produzimos lesões de bouba na asa de canário.

No quarto caso, morrem 56 canários e 18 ficam doentes num total de 287 pássaros. Sintomas: penas arrepiadas e respiração acelerada. Lesões: hepatização pulmonar e comprometimento dos sacos aéreos. Um dêles apresenta ainda depósito de fíbrina na superfície do fígado. O material do pulmão, inoculado por escarificação na pele de canário, produz lesão extensa de bouba no epitélio. O corte histológico mostra inclusões de bouba nas células epiteliais do pulmão.

2. *Traqueíte em galinhas* (2 casos).

1.° caso: Num lote de 1.800 galinhas, 20 morrem e 150 adoecem, com sintomas respiratórios. Lesões: traquéia extremamente congesta e com exsudato catarral amarelado, muito denso; congestão acentuada da mucosa dos seios infra-orbitários. Corte histológico: traqueíte aguda com infiltração por monócitos. Três pintos, inoculados na pele da coxa com exsudato da traquéia, apresentam lesões típicas de bouba, em seis dias.

2.° caso: Num lote de frangas, observa-se traqueíte necrótica com erosão e exsudato. O exame a fresco do exsudato da traquéia mostra numerosas células com inclusões citoplasmáticas. Reprodução experimental de bouba, como no caso anterior.

2. COMPLEXO LEUCÓTICO

Observamos 1.417 casos (7,98%) assim distribuidos: eritroleucose 27; leucose mielóide 53; leucose linfóide 780; ósteopetrose, 9; neurolinfomatose 548 casos.

a. *Eritroleucose*: Dos 27 casos observados, 26 ocorreram em galinha e 1 em angolinha.

b. *Leucose mielóide*: galinhas 49; peru, pato, ganso e pombo, 1 de cada.

c. *Leucose linfóide*: os 780 casos estão assim distribuidos, segundo as espécies animais atacadas: galinhas 762; pato 7; perus 6; canário, cardeal, faisão, ganso e marreco, 1 de cada.

d. *Osteopetrose*: todos os 9 casos são em galinha, e seis dêles estão associados à neurolinfomatose.

e. *Neurolinfomatose*: dos 548 casos, todos em galinha, 169 eram casos de linfomatose ocular, 216 de linfomatose neural e 163 mistos. Quanto às raças atacadas, veja-se a tabela 2.

TABELA 2

Incidência do complexo leucótico aviário em galinha, segundo as raças, de 1949 a 1953

Raças	L. linfóide	Neurolinfomatose
Leves (Leghorn)	6,25%	4,74%
Pesadas (N. Hampshire, Rhode Island)	8,00%	3,48%
Caipiras	1,65%	2,83%

A figura 6 mostra a incidência do complexo leucótico no período de 1931 a 1953; o aumento dos últimos anos deve-se principalmente ao aumento da incidência da leucose linfóide, cujos 137 casos em 1953 representam 9,66% de todos os casos de complexo leucótico ocorridos desde 1931 e 63,72% dos casos de complexo leucótico ocorridos em 1953.

A distribuição do complexo leucótico nos diferentes meses do ano, representada na figura 7, mostra incidência sensivelmente mais elevada de abril a julho. Não foi feito um gráfico separadamente da distribuição dos casos de neurolinfomatose e leucose linfoide, pois o exame dêsses casos mostrou distribuição semelhante, isto é, maior incidência de abril a junho e de abril a agôsto, respectivamente.

3. TUMORES

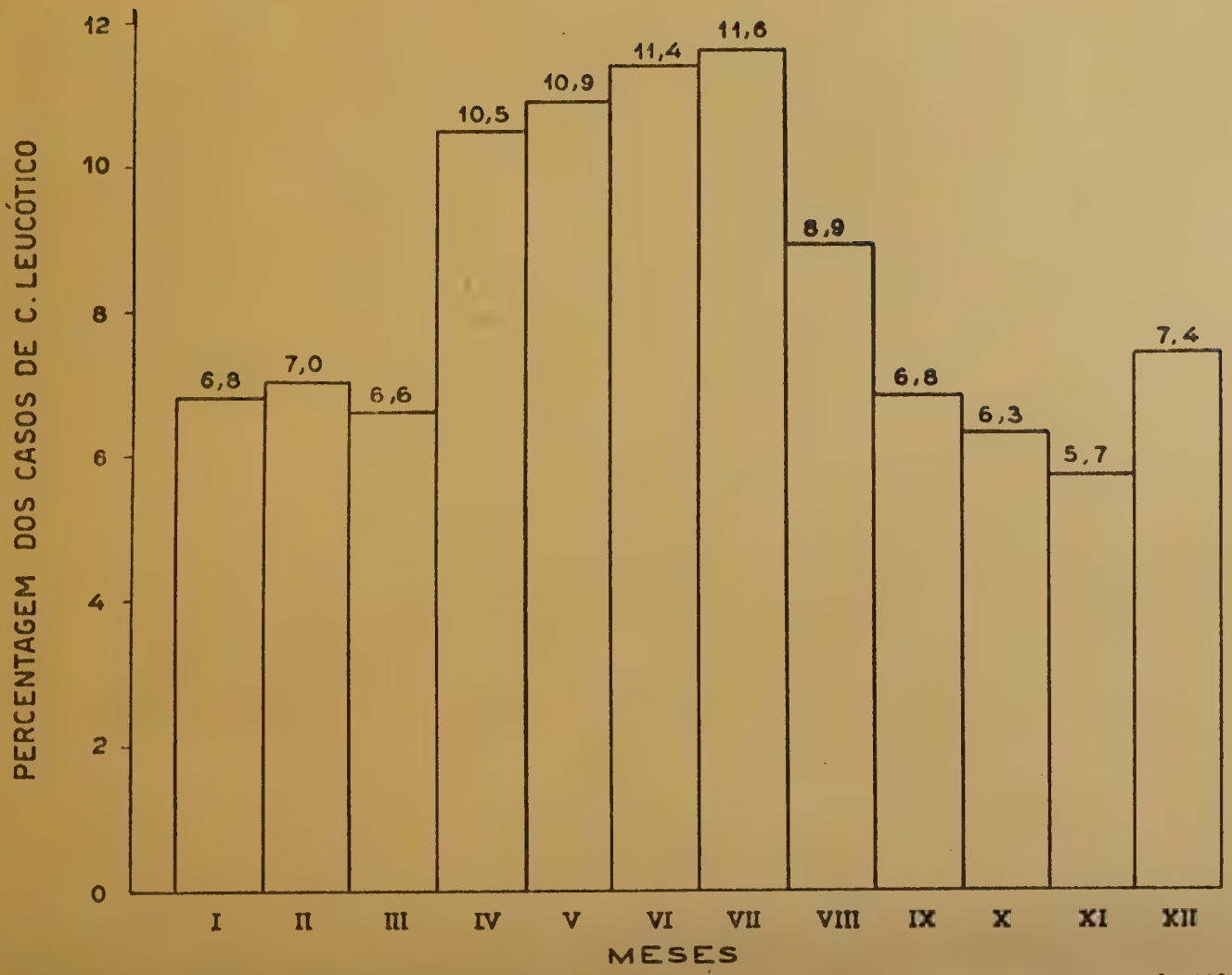
No total de 17.753 casos examinados, registramos 193 (1.08%) neoplasmas, assim distribuidos: galinhas 188; tucano, periquito, ganso, pato e marreco, 1 de cada. A percentagem dos diferentes tipos consta da tabela 3.

TABELA 3

INCIDÊNCIA DOS VÁRIOS TIPOS DE TUMORES AVIÁRIOS

Tecido conjuntivo		Tecido muscular	Vasos sanguíneos e linfáticos	Origem hematoblástica	Tecido epitelial		Nefroma embrionário	Outros
Benignos	Malignos				Benignos	Malignos		
8,2	13,4	2,0	2,0	8,8 (*)	4,1	48,1	8,8	4,1

(*) Não incluimos os casos de leucose, mas apenas os que constam de nossos antigos registros como tumores linfossarcomatosos (2) e sarcoma de células redondas, que podem talvez ser assimilados aos linfocitomas.



MESES	Nº DE CASOS
I	101
II	79
III	81
IV	110
V	118
VI	128
VII	140
VIII	138
IX	120
X	148
XI	121
XII	133

Fig. 7 — Freqüência relativa do complexo leucótico, nos diferentes mêses do ano, de 1930 a 1953.

RELAÇÃO GERAL DOS 193 TUMORES OBSERVADOS EM SÃO PAULO

A. Neoplasmas do tecido conjuntivo 42 (21,7%).
1. Benignos 16 (8,2%):

Fibroma	12
Fibrocondroma	1
Mixoma	2
Lipoma	1

2. Malignos 26 (13,4%)

Fibrossarcoma	3
Sarcoma histiocítico	17
Sarcoma osteogênico	3

B. Neoplasmas do tecido muscular 4 (2%)

Leiomioma	3
Rabdomiossarcoma	1

C. Tumores dos vasos sanguíneos e linfáticos 4 (2%)

Hemangioma	3
Endotelioma (tipo Furth)	1

D. Tumores de origem hematoblástica 17 (8,8%)
E. Tumores pigmentados 1 (0,5%)

Melanoma	1

F. Tumores de tecidos epiteliais 101 (52,3%)
1. Benignos 8 (4,1%)

Papiloma	1
Adenoma	4
Hiperceratoma	2
Leiomioma	1

2. Malignos 93 (48,1%)

Carcinoma hepatocelular	2
Carcinoma colangio celular	2
Carcinoma liomiomatoso (seg. Jackson)	1
Acantoma	6
Adenocarcinoma	82

G. Neoplasmas das serosas 1 (0,5%)

Mesotelioma	1

H. Neoplasmas mistos 23 (11,9%)

Nefroma embrionário	17
Timoma	1
Cistos	4
Cisto dermóide	1

4. PSITACOSE E ORNITOSE

Verificamos um único caso de psitacose em papagaio, que apresentava à necrópsia aumento de volume do baço e fígado e coloração castanho-escura dêste último órgão. Os camundongos inoculados no peritônio com suspensão dêstes órgãos em água fisiológica morriam em 8-9 dias; todavia, sòmente a partir da 6.ª passagem começaram os camundongos a apresentar, além do aumento acentuado do baço (em um dêles, 0,335g), copioso exsudato peritonial e supradiafragmático, de aspecto viscoso e côr branca, ligeiramente amarelada, e exsudato perihepático, sob forma de depósito branco de fibrina. Corpúsculos LCL reveláveis em grande quantidade sòmente a partir da 6.ª passagem. A Ld_{50} do vírus para camundongo correspondia a 0,2 cm^3 da suspensão a 1:2.000.000 de baço infetado.

Quanto à ornitose, verificamos um caso em pombo correio, que apresentava corrimento ocular (negativo quanto a corpúsculos) e baço ligeiramente aumentado. Com material dêsse caso inocularam-se no peritônio cinco camundongos, que foram sacrificados 17 dias depois, aparentemente bons; a reinoculação do baço no cérebro de camundongo determinou a morte dos animais em 5-6 dias, com presença de grande número de corpúsculos LCL, reveláveis pelo método de Castañeda. O vírus isolado é sempre mortal para camundongos por via cerebral e excepcionalmente por via peritonial.

B — DOENÇAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS

1. SINUSITE

Observamos 26 casos em perus, o que representa 4.6% dêstes animais enviados ao laboratório.

2. INFECÇÕES ESTAFILOCÓCICAS

Verificamos 87 casos (0,49%) assim distribuídos: galinha 67; canário 10; pombo 4; marreco 2; pato 2; calafate (*Padda oryzivora*) 1 e sabiá 1. Dos casos referidos, 25 são de artrite, 19 de edema ou

abcesso subcutâneo, 33 de septicemia, 6 de abcesso plantar, 2 de oftalmia e 2 de edema da barbela.

3. INFECÇÕES ESTREPTOCÓCICAS

Observamos 2 casos, em avinhado e papagaio, respectivamente. Êste último apresentava diarréia esverdeada com estrias de sangue, dispnéia, corrimento mucoso ocular, bilateral, e penas arrepiadas. Do sangue isolou-se estreptococo hemolítico.

4. INFECÇÕES POR *PSEUDÒMONAS*

Dos 34 casos observados, 25 ocorreram em galinha (19 dos quais em pintos), 3 em peru, 2 em faisão, 2 em canário, 1 em vira e 1 em pato. Lesões septicêmicas em 30 casos, e edema ou abcesso subcutâneo em 4 casos. Entre os pintos observa-se às vêzes grande mortalidade, apresentando as aves edema da cabeça, pescoço e região da pálpebra.

5. INFECÇÕES POR *ALCALIGENES*

Vimos 2 casos (0,01%), respectivamente em galinha e ôvo de galinha.

6. SALMONELOSES (exclusão de pulorose e tifo)

Verificamos ao todo 56 casos (0,31%) nas seguintes espécies de aves: canário 22, pombo 13; papagaio 5; pato 4; galinha 4; marreco, angola, pintassilgo, papa-capim, pixoxó, saíra, azulão e inhambu, 1 de cada.

Cepas identificadas sorològicamente:

a) *S. newport,* de gema não reabsorvida de pintos;
b) *Salmonella* sp., de galinha, pintassilgo, papacapim, pixoxó e angola;
c) *S. typhi-murium* var. *copenhagen,* de pombos;
d) *S. typhi-murium,* de pato, marreco, canário, galinha, saíra, azulão, inhambu e papagaio.

Como casos interessantes, assinalamos artrite e abcesso subcutâneo em pombo.

Lesões: em casos agudos, congestão e hemorragia intestinal; aumento de volume e coloração castanha do baço e do fígado, diarréia sanguinolenta. No fígado, às vêzes recoberto de fibrina, observam-se pontos de necrose. Histopatologia: necroses em foco das células hepáticas; proliferação das células linfóides no fígado e pulmão; congestão generalizada.

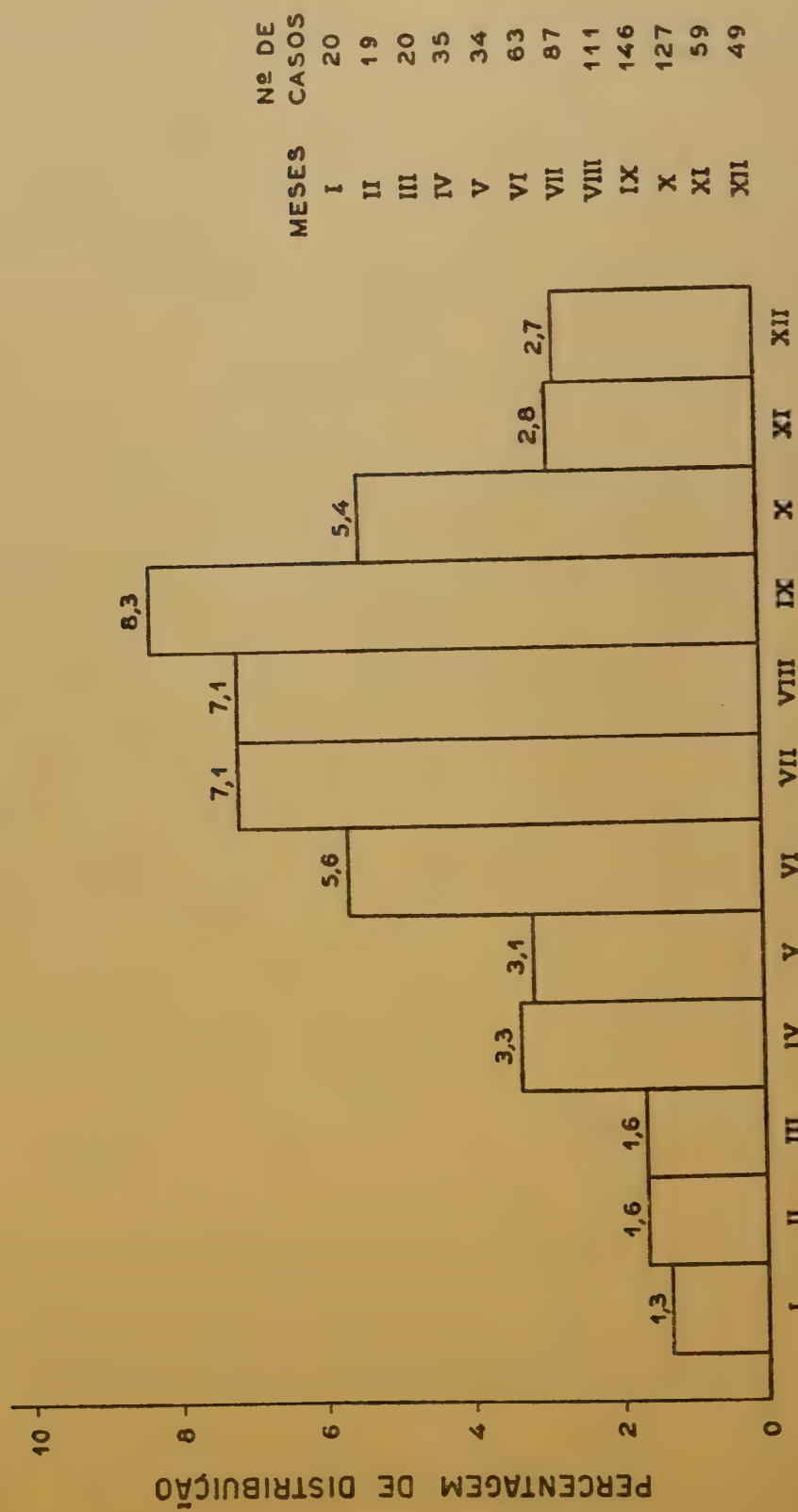


Fig. 8 — Distribuição relativa dos casos de pulorose, pelos diferentes mêses do ano, de 1931 a 1953.

7. PULOROSE

Observamos 770 casos (4,43%) nas seguintes espécies: galinha 762 (adultos 18% e pintos 82%); pato 3; peru 4 e uru (*Odontophorus capueira*) 1 caso.

A figura 8 mostra a distribuição dos casos de pulorose, pelos diferentes meses do ano, no período de 1931 a 1953. Verifica-se a maior incidência justamente nos meses de maior produção de pintos.

A tabela 4, relativa aos anos de 1949 a 1953, permite avaliar a incidência da pulorose em diferentes raças:

TABELA 4
Sensibilidade de diferentes raças de aves à pulorose
(1949-1953)

RAÇA	N.º de aves	N.º de casos	%
Leve (Leghorn)	2109	41	4,9
Pesada (New Hampshire, etc.)	2957	414	16,0
Caipira	424	0	1,4

CASO INTERESSANTE DE LOCALIZAÇÃO ARTICULAR:

Observamos um caso de inchaço da articulação tibio-társica de galinha. A ave apresentava nódulos duros, em número de cinco em cada pata, ocupando o perímetro da articulação e situação um pouco acima e abaixo; alguns apresentam flutuação. Ao nível das articulações, vêm-se nódulos de tamanho variável, em geral de 1 cm de diâmetro, verdadeiras bolsas de pus, formadas pelos tecidos fibroso e fibrotendinoso, que reforçam a articulação. Algumas destas bolsas estão bem junto do ôsso, sem que êste se ache comprometido. Aberta a cavidade sinovial, observa-se no seu interior quantidade apreciável de pus avermelhado: piócitos, monócitos e células da sinovial.

Cultura do pus: *Salmonella pullorum.* Corte histológico: sinovite, panartrite e tubulonefrite.

Pesquisa de variantes de S. pullorum.

Em São Paulo não conseguimos demonstrar a existência da forma variante em 62 culturas de *S. pullorum,* isoladas em igual número de pintos e galinhas portadores, sendo 44 recentes, 16 com mais de 2 anos e 2 conservadas em laboratório há mais de 15 anos. Os exames foram feitos de acôrdo com a técnica preconizada por Wright e Edwards (Am. J. Vet. Res., 1948, 9:386), com sôro anti-

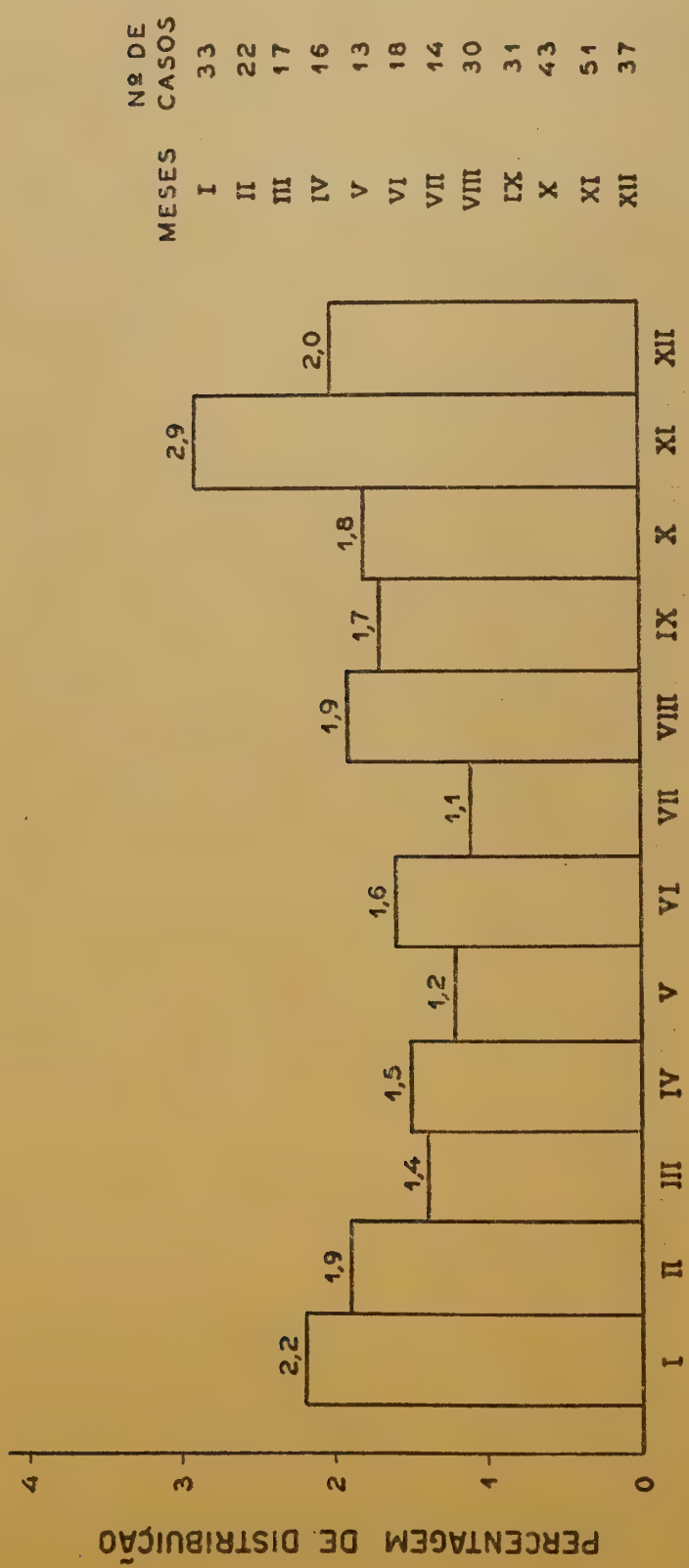


Fig. 9 — Distribuição relativa dos casos de tifo aviário, pelos diferentes mêses do ano, de 1931 a 1953.

Proteus (XII_2) enviado por Binns e Gwatkin e sôro anti-*S. paratyphi B var. durazzo*, adsorvido por *S. reading* (XII_3). O contrôle foi feito com 15 variantes e 19 "standards" fornecidos por Binns, Edwards, Wright e Gwatkin, aos quais consignamos aqui nossos agradecimentos.

8. TIFO AVIÁRIO

Os 325 casos (1,82%) de tifo aviário observados assim se distribuem: galinha 319 (89% adultos e 11% pintos); peru 4; ganso 1 e macuco 1. Do total de casos, 247 eram puros e 78 estavam associados a outras moléstias.

A figura 9 mostra a distribuição pelos diferentes meses do ano.

A tabela 5, relativa ao período de 1949 a 1953, dá idéia da incidência do tifo aviário em diferentes raças:

TABELA 5
Sensibilidade de diferentes raças ao tifo aviário

RAÇA	N.º de aves	N.º de casos	%
Pesada (New Hampshire, etc.)	2109	36	1,7
Leve (Leghorn)	2957	45	1,5
Caipira	424	15	3,5

9. COLIBACILOSE

Observaram-se 93 casos (0,52%) assim distribuidos: galinha 70; canário 7; pato 3; pintassilgo 3; peru 2; marreco 2; pombo, coleirinha, papagaio, azulão, guarundi e inhambu, 1 de cada.

Das culturas isoladas, 80 pertenciam ao grupo *Escherichia* e 13 ao grupo "Paracolon".

10. CÓLERA

Dos 1.060 casos (5,97%) de cólera, 98% ocorreram em aves adultas e 2% em pintos, tendo sido atacadas as seguintes espécies: galinhas 813; patos 162; perus 29; gansos 20; marrecos 20; pombos 6; angola 6; faisão, periquito, papagaio e arara, 1 de cada.

A figura 10 mostra a distribuição dos casos de cólera pelos meses do ano, onde se evidencia a maior ocorrência nos meses de janeiro a abril, com acme em fevereiro e março.

A incidência da cólera em aves de raças pesadas, leves (Leghorn) e mestiças foi respectivamente de 1,89%, 1,72% e 17,43%, o que confirma o papel importante desempenhado pelas últimas, na epizootologia da doença.

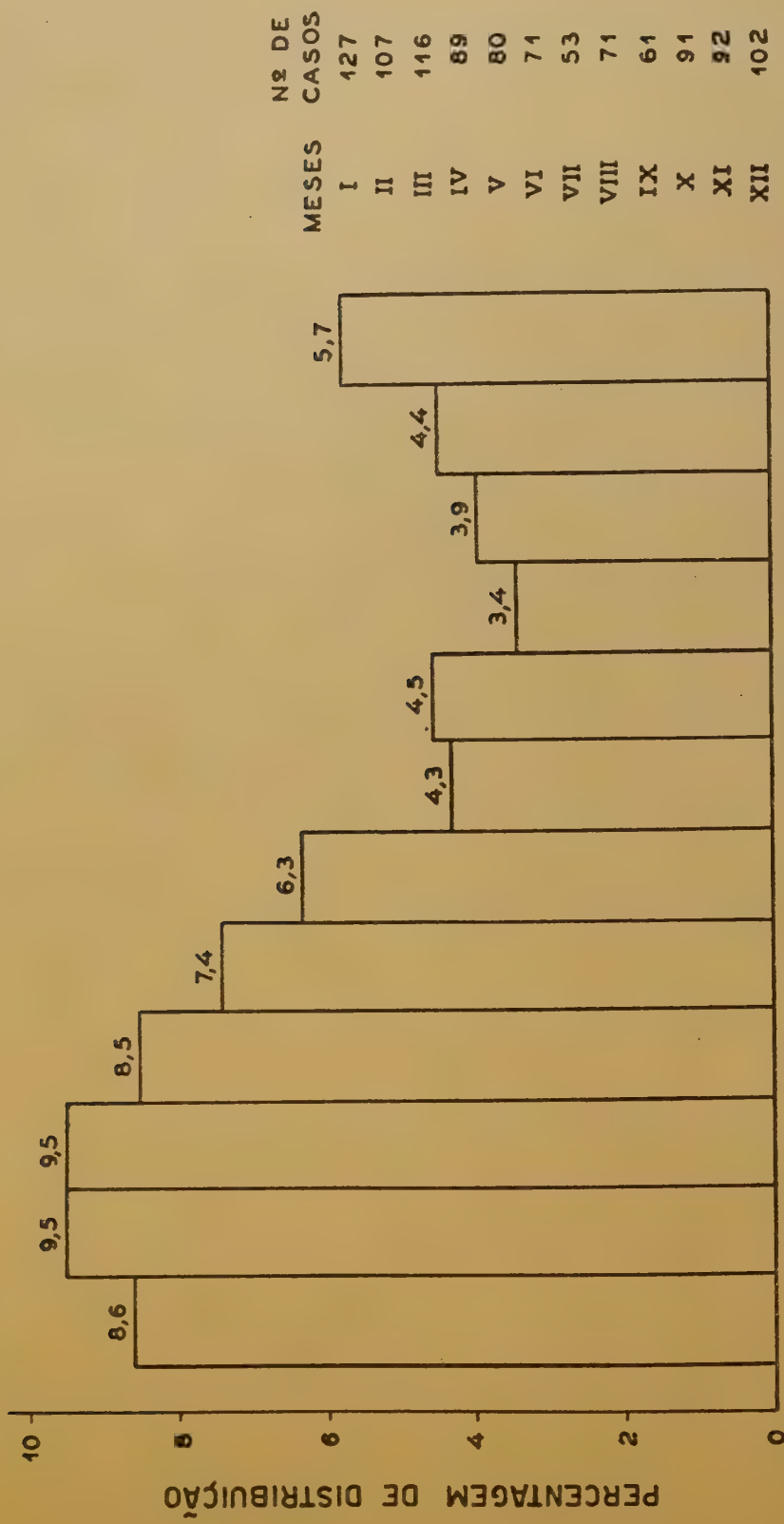


Fig. 10 — Freqüência comparada de cólera, nos diferentes mêses do ano, de 1930 a 1953.

Casos interessantes:

a) Galinha portadora crônica de cólera. Contratura do pescoço para trás; mantém-se sentada sôbre os tarsos. Histopatologia: paquimeningite e osteíte dos ossos do crânio.

b) Galinha com artrite tíbio-társica bilateral. De exsudato claro da articulação isola-se cultura pura de *Pasteurella multocida*, tipo fluorescente.

11. INFECÇÃO POR *BACT. ARTHROPYOGENES*

Verificamos apenas 1 caso em galinha.

12. CORIZA

Dos 1.024 casos (5,76%) de coriza, 987 ocorreram em galinhas e 7 em perus; sintomas identicos foram vistos ainda em pombo 6, pato 6, papagaio 7, faisão 3, canário 2, periquito, perdiz, ganso, azulão, marreco e vira, 1 de cada.

Consta da tabela 6 a incidência da doença em diferentes raças, segundo dados de 1949 a 1953.

TABELA 6
Incidência da coriza em galinha

RAÇA	N.º de aves	N.º de casos	%
Leve (Leghorn)	2109	215	10,1
Pesada (New Hampshire, etc.)	2957	215	7,2
Mestiça (caipira)	424	65	15,3

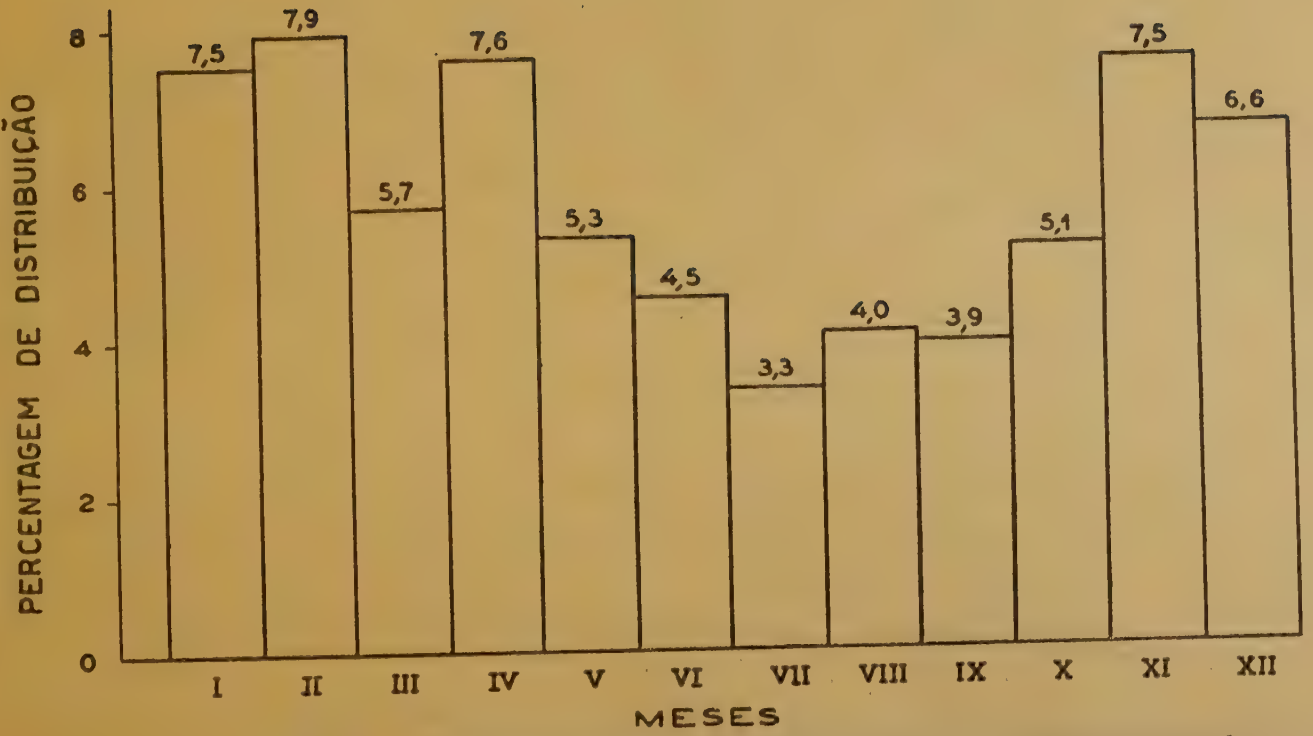
A figura 11 mostra a distribuição dos casos de coriza pelos diferentes meses do ano, verificando-se menor incidência nos meses de inverno, que entre nós representa um período favorável para a criação.

13. BOTULISMO

Observaram-se apenas 5 casos, todos em galinha.

14. TUBERCULOSE

Todos os casos de tuberculose diagnosticados no Instituto Biológico são anteriores a 1944. Dos 37 casos observados até 1943, 24 provieram, em épocas diversas, do mesmo foco. Espécies atacadas: galinha 26; marreco 5; cisne 2; peru, angola, faisão e papagaio (*Amazona aestiva*), 1 de cada.



MESES	Nº DE CASOS
I	111
II	89
III	69
IV	79
V	58
VI	51
VII	40
VIII	62
XI	70
X	120
XI	157
X	118

Fig. 11 — Freqüência comparada de casos de coriza, nos diferentes mêses do ano, de 1931 a 1953.

A tuberculose do papagaio foi causada pelo tipo humano do bacilo, que se demonstrou não patogênico para galinha. A ave apresentava no flanco direito, englobando as três últimas costelas, grande processo inflamatório, em parte caseificado e purulento. Ao nível da cabeça da tíbia direita (face interna), formação grande, em forma de bolsa, com fístula na extremidade superior e conteúdo purulento. Entre esta e a massa da região costal, nódulo bem circunscrito de conteúdo caseoso. Ao nível da região clavicular esquerda, nódulo subcutâneo duro, do tamanho de avelã, conteúdo caseoso. Na base da língua, lado direito, nódulo duro. Medula óssea com pequeninos nódulos. Bacilos ácido-resistentes no esfregaço de pus e material caseoso. Cinco cobaias, inoculadas na virilha, apresentam reação ganglionar acentuada e baço aumentado, com tubérculos típicos; raros tubérculos pequenos no fígado e pulmão. Isolou-se cultura sêca, vegetando bem em meio com glicerina e escassamente em meio sem glicerina.

15. ESPIROQUETOSE

Observaram-se 1.154 casos (6,5%), a saber: galinha 1.116 (adultas 998, aves em crescimento 103 e pintos 15); pato 22; ganso 7; marreco 5; peru 4.

A distribuição dos casos de espiroquetose pelos meses do ano (fig. 12), mostra incidência sensìvelmente maior nos meses de janeiro a abril.

C — DOENÇAS PRODUZIDAS POR FUNGOS

1. MONILIOSE (Sapinho)

Observaram-se 5 casos, sendo 3 em galinha, 1 em pombo e 1 em papagaio. Nas duas primeiras espécies as lesões consistiam em placas branco-amareladas, rugosas, aderentes à mucosa do papo, esôfago, laringe (exterior), soalho bucal e língua. O corte histológico revela reação pseudo-diftérica acentuada, com necrose ou destruição do epitélio e infiltração da mucosa. No caso do papagaio a micose circunscreveu-se à mucosa da comissura do bico, aí se formando ulceração recoberta de espessa pseudomembrana branco-acinzentada.

O exame microscópico, a fresco, das placas revela forma de lêvedo ou micélio, cuja semeadura em meio de Bordet ácido (pH 5,0) sem sangue resulta na produção de colônias abundantes, brancas e lustrosas de *Candida albicans*.

2. FAVO

Todos os 18 casos (0,1%) ocorreram em galinha, isolando-se quase sempre o *Achorion gallinae* e uma vez o *Achorion passerinum*. Neste caso tratava-se de um galo, que apresentava lesões típicas

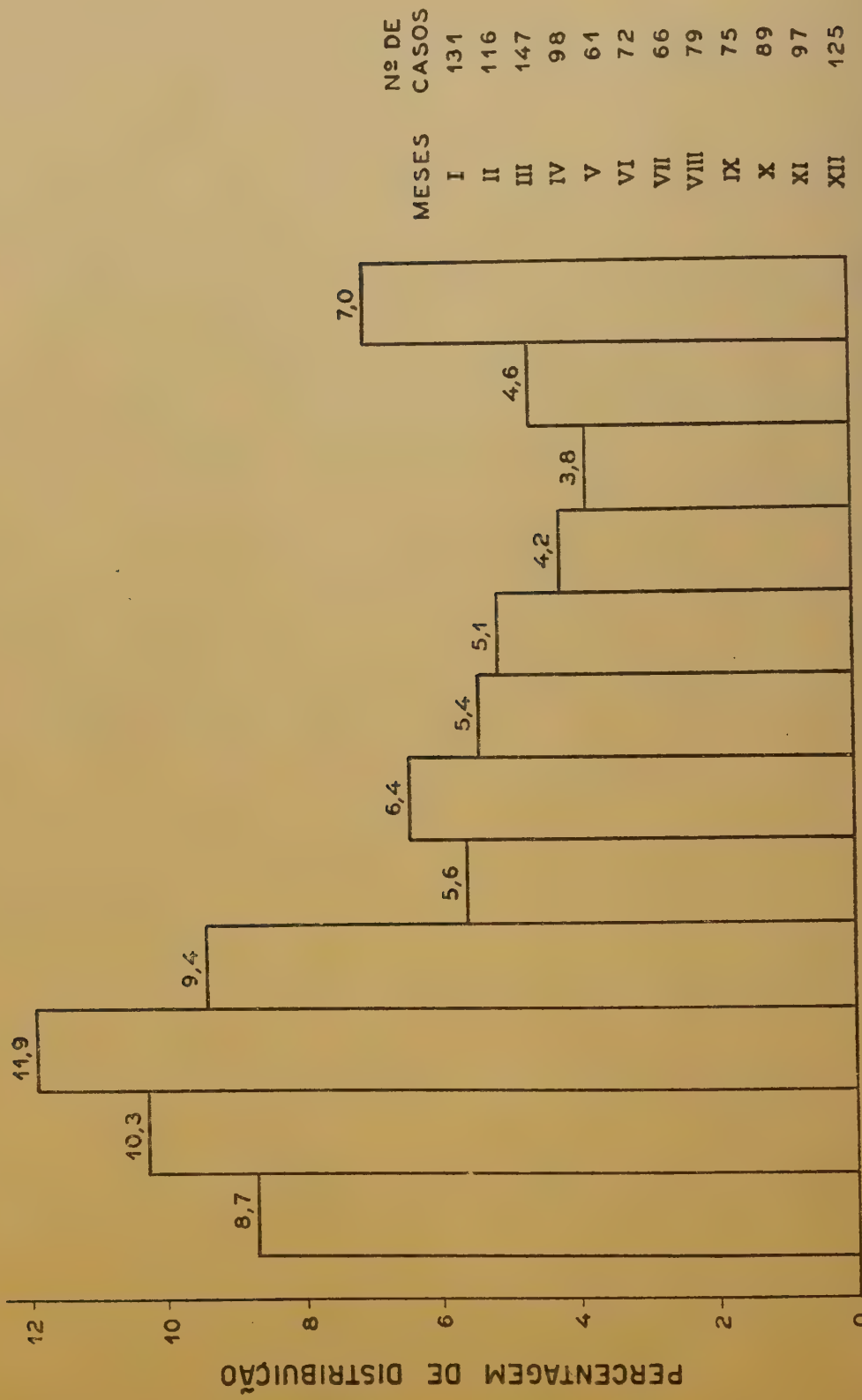


Fig. 12 — Freqüência da espiroquetose nos diversos mêses do ano, de 1931 a 1953.

porém discretas, de favo. A lesão era muito superficial e, quando retirada, a pele de baixo se mostrava perfeitamente normal. Em Sabouraud obtem-se colônia cotonosa, que não cora o meio, sulcada e gretada. Abundância de clamidosporos.

3. MUCORMICOSE

Observou-se 1 caso em papagaio, que apresentava pulmão esverdeado e com nódulos. Do órgão isolou-se fungo do grupo *Mucorina*. Corte histológico de pulmão: pneumonia e massas de grãos pretos (esporos). Não se vêem cabeças.

4. ASPERGILOSE

Registraram-se 57 casos (0,32%), assim distribuidos: galinha 36; pato 4; canário 4; macuco 3; bico de lacre 2; peru 2; vira 2; papagaio, pombo, tico-tico e pixoxó, 1 de cada.

Localização das lesões: pulmões, sacos aéreos e mesentéricos, 49; olhos (queratomicose aspergílica), 5; lesões cutâneas, 3.

Na maioria dos casos isolou-se o *Aspergillus fumigatus;* do bico de lacre, todavia, foi isolado o *Aspergillus flavus*.

Nos pássaros por nós examinados as lesões predominantes são do pulmão. Quanto ao vira, apresentava, além das lesões dos pulmões e sacos aéreos, nódulos branco-aporcelanados no pericárdio e zona extensa de necrose no miocárdio; o *Aspergillus fumigatus* foi isolado em cultura pura do pulmão e do nódulo do miocárdio.

D — DOENÇAS PRODUZIDAS POR PROTOZOARIOS

1. TRICOMONOSE

Observaram-se 106 casos (0,59%): galinha 73; pombo 18; pato 6; peru 6; ganso, jaó e angola, 1 de cada.

A incidência foi um pouco maior em animais novos (62%). Dos 106 casos, 42 eram puros e 64 associados a outras moléstias.

Quanto a localização, 90 casos eram do intestino, 16 da bôca, faringe e esôfago e 1 do fígado. Considerando-se, todavia, exclusivamente os 18 casos ocorridos em pombos, a distribuição foi a seguinte: bôca e faringe 16; intestino 1, e fígado 1.

Além dos casos bem identificados de tricomonose, registram-se 11 casos (10 em galinhas e 1 em marreco) classificados como "flagelose", pela grande abundância de flagelados encontrados nas fezes.

2. ENTEREPATITE

Os 418 casos (2,35%) de enterepatite assim se distribuem segundo as espécies atacadas: galinha 204, (54 adultos e 150 novos);

peru 195 (146 adultos e 49 novos); pavão 17; angola e faisão, 1 de cada.

Considerando-se, todavia, o número de aves examinadas de cada espécie, a incidência em relação a perus e galinhas é de 34,8% e 1,3% respectivamente.

3. SARCOSPORIDEOSE

Observaram-se 9 casos, sendo 6 em galinhas e os demais em tucano, pombo e marreco, respectivamente.

Em 8 casos a localização foi nos músculos estriados do corpo; no marreco, todavia, o órgão atingido foi o miocárdio.

4. TOXOPLASMOSE

A toxoplasmose foi observada 58 vêzes (0,35%) nas seguintes espécies: pombo 51, marreco 3, canário 3 e galinha 1.

Em relação ao número de pombos examinados, a toxoplasmose representa 16,4% dos casos de doenças observados nesses animais.

Com excepção dos casos ocorridos em marrecos, todos os demais foram diagnosticados pelo isolamento e identificação do toxoplasma. Quanto aos marrecos, o diagnóstico baseou-se no encontro de protozoários com morfologia idêntica à do toxoplasma, nos cortes do pulmão, coração, baço, fígado e intestino.

Do mesmo modo que nos pombos, o toxoplasma pode ser evidenciado no exsudato ocular dos canários, no período final da doença.

Convém salientar que 50% dos casos de toxoplasmose ocorreram nos meses do verão e 70% no período de janeiro a maio.

5. EIMERIOSE

Verificaram-se 2.888 casos (16,26%) de eimeriose nas seguintes espécies: galinha 2.719; peru 62; angola 50; pombo 23; pavão 7; perdiz 6; faisão 5; pato 8; marreco 4; macuco 2; jurití e papagaio, 1 de cada.

Dos casos observados por nós em São Paulo, 91% ocorreram em aves novas.

A figura 13 mostra maior incidência da moléstia nos meses de setembro a dezembro, com acme em novembro.

Espécies do parasita verificadas em São Paulo: *E. tenella, E. necatrix, E. mitis, E. maxima, E. acervulina* em galinha; *E. rhyncoti* em perdiz brasileira (*Rhyncotus rufescens*); *E. meleagridis* em perus e *E. labbeana* em pombos.

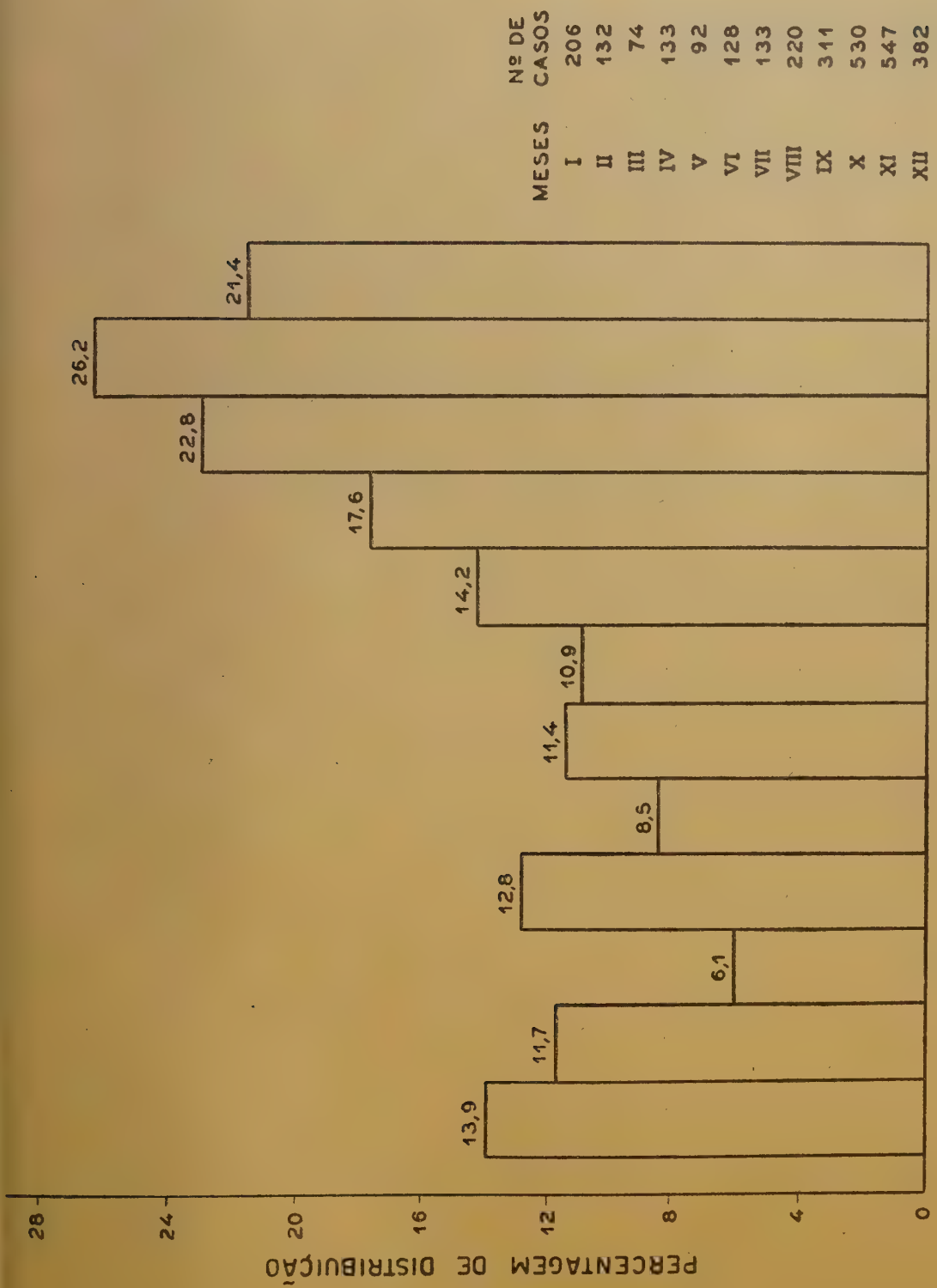


Fig. 13 — Freqüência comparada da eimeriose nos diferentes mêses do ano, no período de 1930 a 1953.

6. ISOSPOROSE

Observaram-se 48 casos, que representam 13,1% dos pássaros enviados para exame. A doença foi por nós assinalada em pintassilgo 19; canário 15; pardal 3; pixoxó 2; bico de lacre 2; patativa 2; pássaros não identificados 2; tico-tico, sabiá e gaturamo, 1 de cada.

7. MALÁRIA

Observaram-se 17 casos de malária em canários, o que representa 4,6% dos pássaros em geral e 6,7% dos canários examinados. Em 18 vêzes foi identificada a espécie *Plasmodium cathemerium* e 1 vez a espécie *P. relictum*. Mortalidade grande, em geral superior a 50%. Lesões macroscópicas mais acentuadas: fígado e baço aumentados de volume e de coloração castanha escura.

8. HEMOGREGARINOSE

Observaram-se 4 casos, todos em canários.

9. HEMOPROTEOSE

Verificamos 13 casos, sendo 12 em pombos e 1 em calafate (*Padda oryzivora*).

E. HELMINTOSE

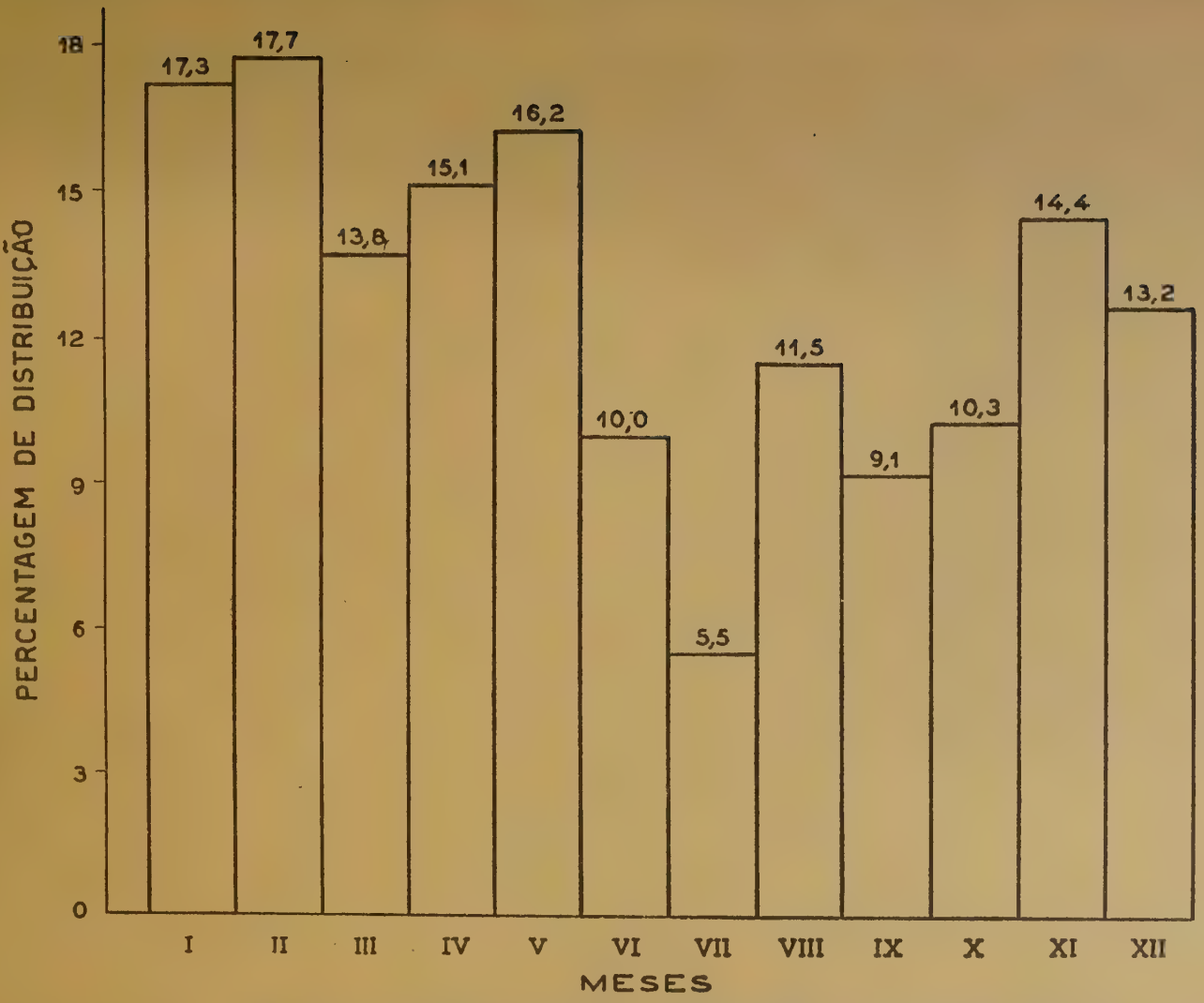
Registraram-se casos de helmintose, em número de 2.243 (12,6%) nas seguintes espécies: galinha 1.988; pombo 90, angola 73; peru 27; pato 15; faisão 9; pavão 5; marreco 4; perdiz 3; sabiá 2; uru 2; gaivota (*Sterna* sp) 2; marreca Irerê 2; pinto d'água 2; mutum, canário, codorna, martim pescador, pardal, juriti, marcejão, corta-mar, batuira de praia, cardeal, papagaio, marreca d'água, ema, tucano, pixoxó, inhambu e coruja do campo, 1 de cada.

A figura 14 mostra que a menor incidência da helmintose ocorre nos meses do inverno e a maior nos meses de janeiro e fevereiro.

São os seguintes os principais tipos de helmintose observados e sua freqüência:

Ascaridiose	1611	Oxispirurose	2	Cestóides	434
Capilariose	454	Estrongiloidose .	6	Trematóides	13
Tetramerose	503	Microfilária	2	Acantocéfalos ...	6
Heteraquiose	422	Nematoda sp. ...	2		
Acuariose	29	Singamose	32	Total geral	3516

O total geral assinalado foi observado em 2.243 aves, o que indica associação de um ou mais tipos de helmintose em vários animais. A relação das espécies identificadas e dos respectivos hospedeiros será objeto de publicação à parte.



MESES	Nº DE CASOS
I	256
II	200
III	168
IV	157
V	176
VI	112
VII	67
VIII	178
IX	162
X	240
XI	291
XII	236

Fig. 14 — Freqüência comparada de helmintose, nos diferentes mêses do ano, de 1930 a 1953.

F. ARTRÓPODOS PARASITAS

Observaram-se 322 casos (1,8%), assim distribuidos: *Acarina*, 214; *Insecta*, 108.

Espécies atacadas: galinha 277; canário 23; pombo 4; faisão 4; peru 3; perdiz 2; sabiá 2; pavão, pardal, periquito, macuco, corrupião, calafate e gaivota, 1 de cada. Em publicação à parte se apresentará relação das espécies identificadas de artrópodes e seus hospedeiros.

G. DOENÇAS DA NUTRIÇÃO

1. RAQUITISMO

Foram vistos 185 casos (1,04%), todos em aves novas, assim distribuidos: galinha 150; peru 28; pombo 3; ganso, marreco, faisão e pato, 1 de cada.

2. PEROSE

Os 20 casos (0,11%), todos em aves novas, foram observados em galinha 17, faisão 2 e peru 1.

3. AVITAMINOSE A

Observados apenas 2 casos (0,01%) em galinha.

4. GÔTA

Os 916 casos (5,15%) observados, assim se distribuiram segundo as espécies atacadas: galinha 852; peru 21; pato 13; canário 9; pombo 4; ganso 3; angola 3; perdiz 3; marreco 2; faisão 2; pássaro não identificado, arara, melro e periquito, 1 de cada.

Localização: visceral, 154; renal, 756; pericárdica, 6. Dos casos viscerais, 2 apresentaram artrite, um dêles com massa caseosa na articulação.

H. DOENÇAS DOS ÓRGÃOS E APARELHOS

APARELHO DIGESTIVO

(827 casos; 4,65%)

1. *Cavidade bucal*

1.1	Campilognatia (lâmina do bico, torta) : galinha	1
1.2	Necrose do bico: papagaio	1
1.3	Ulceração fúngica da comissura do bico: papagaio	1

2. *Papo*

2.1	Ingluvite: galinha 21; peru 1, total	22
2.2	Úlcera perfurada do papo: galinha	1

3. *Proventrículo*

3.1	Hemorragia: galinha	1
3.2	Dilatação: galinha 9; perdiz 2; peru 1; pato 1, total	13
3.4	Dilatação e empachamento: galinha	1
3.5	Perfuração com formação de bolsão caseoso: galinha	1
3.6	Obstrução do proventrículo: pato	1

4. *Moela*

4.1	Perfuração (prego, arame, etc.): galinha, 3 papagaio, perdiz, pombo e marreco 1 de cada; total	7
4.2	Dilatação: ganso 1, galinha, 1 total	2
4.3	Empachamento: pombo 1, galinha 1, total	2
4.4	Erosão da moela: pintos	2

5. *Intestino*

5.1	Enterite hemorrágica: galinha, 20; canário 2; bico de lacre, periquito, peru, pavão e papagaio 1 de cada; total	27
5.2	Enterite catarral: galinha 7; canário 2; peru 1; total	10
5.3	Enterite descamativa: galinha	1
5.4	Enterite poliposa: galinha	1
5.5	Enterite ulcerativa: galinha 6; pombo 3; total	9
5.6	Enterite não especificada: galinha 14; pato 3; periquito e canário 1 de cada; total	19
5.7	Fecaloma: pombo, pato, galinha, araponga, 1 de cada; total	4
5.8	Perfuração intestinal: galinha, 11; pato 1; total	12
5.9	Invaginação intestinal: galinha 2; pombo 1; total	3
5.10	Obstrução intestinal: canário	1
5.11	Hérnia intestinal: galinha	2
5.12	Tiflite: galinha	5
5.13	Hiperplasia do ceco: galinha	1
5.14	Distensão do ceco por oclusão: peru	1
5.15	Empachamento do reto: galinha 13; perdiz, pato, 1 de cada; total	15
5.16	Quisto do reto: galinha	1
5.17	Megacolon mecânico: galo	1

6. *Cloaca*

6.1	Cloacite: galinha 7; peru 1; total	8
6.2	Prolapso da cloaca: galinha 27; canário 1; total	28

7 *Uropígio*

7.1	Uropigite: galinha 2, canário e azulão, 1 de cada; total	4

8 *Bolsa de Fabrício*

8.1	Degeneração cística da bolsa de Fabrício: galinha	2

9 *Fígado*:

9.1	Necrose, em geral associada à do baço: galinha, 141; pato 9; marreco 7; canário 5; pombo 5; peru 5; ganso 3; angola 2; azulão, marreco, pavão e perdiz, 1 de cada; total	181
9.2	Hepatite e perihepatite, associada freqüentemente a esplenite: galinha 44; pato 5; periquito 4; marreco 3; canário, peru, pombo, ganso e angola, 1 de cada; total	61
9.3	Abcessos: papagaio e galinha, 1 de cada; total	2
9.4	Cirrose: galinha, 12; peru 2; angola 1; total	15
9.5	Colecistite: galinha	1
9.6	Infiltração gordurosa: galinha 9; peru 2; pato 1; total	12
9,7	Degeneração: galinha 4; marreco e pombo, 1 de cada; total	6
9.8	Hemorragia subcapsular, por distrofia, degeneração, tumores, etc., seguida freqüentemente de hemorragia interna: galinha, 107; canário, sabiá, perdiz e tucano, 1 de cada; total.....	111
9.9	Angiectasia hepática (cistos hemorrágicos e dilatação dos vasos) : galinha 24; cisne 1; total	25
9.10	Acidentes:	
	a) penetração de arame no fígado: faisão ..	1
	b) penetração de arame no colédoco: galinha	1

10. *Ascite*, associada principalmente a leucoses e tumores: galinha 43; canário 2; perdiz, faisão e macuco, 1 de cada; total 48

11. *Cavidade peritonial*
    11.1 Peritonite, associada em 9 casos à perfuração do intestino, em 5 à da moela, em 1 à do fígado e em 1 à presença de rinonissíneos: galinha, 124; peru 4; pato 3; marreco 2; ganso 2; pombo, angola, canário, perdiz e ema, 1 de cada; total 140

12. *Umbigo*
    12.1 Hérnia umbilical: pinto 1
    12.2 Onfalite: pinto 1

APARELHO RESPIRATÓRIO
(835 casos; 4,7%)

1. *Difterias não específicas*: galinha 135; papagaio 6; pombo 6; peru 5; canário 3; inhambu 2; pavão e angola, 1 de cada; total 159

2. *Traqueo-bronquites* (gôgo, laringotraqueítes não especificas): galinha 153; papagaio 4; pombo 3; faisão 2; marreco, canário, angola e perdiz, 1 de cada; total 166

3. *Pneumonia*: galinha 193; marreco 7; canário 5; peru 3; pato 3; papagaio 2; faisão 2; arara, pombo e ganso, 1 de cada; total 218

4. *Congestão pulmonar*: galinha 200, marreco 5; pato 4; pássaro não identificados 2; canário 2; periquito 2; total 215
   Não estão incluídas neste grupo, as peritonites associadas com alterações do aparelho reprodutor.

5. *Hemorragia pulmonar*: galinha e pombo, 1 de cada; total 2
6. *Edema pulmonar*: galinha 1
7. *Enfarte pulmonar*: galinha 1
8. *Aerocistite*: galinha 49; peru 11; faisão 3; canário 2; arara, periquito, gaturamo e papagaio, 1 de cada; total... 69

9. *Asfixia*
   9.1 Por compressão: galinha 1
   9.2 Por excesso de medicamento na traquéia: galinha 2; papagaio 1; total 3

APARELHO CIRCULATÓRIO
(11 casos; 0,62%)

1. *Pericardite*: galinha 38; pato 3, ganso 2; pombo, papagaio, marreco e arara, 1 de cada; total 47

2. *Hidropericárdio*: galinha 4
3. *Miocardite*: galinha 14; marreco 3; jandaia 1; total 18
4. *Anomalia do coração*: ausência da válvula tricúspide, com grande dilatação do coração direito, faisão 1
5. *Endocardite*: proliferações endocárdicas na válvula auriculo-ventricular esquerda e na embocadura da aorta; galinha 1
6. *Arterite* (no caso observado em papagaio havia depósitos de agulhas de colesterol na íntima e proliferação histrocitária na túnica média) : perus 2; galinha e papagaio, 1 de cada; total 4
7. *Anemia*: galinha 7
8. *Baço*
   - 8.1 Necrose: galinha 14; canário 2; pato, marreco e pombo, 1 de cada; total 19
   - 8.2 Ruptura com hemorragia e morte; galinha 2
   - 8.3 Degeneração hialina: galinha 1
9. *Hemorragias consequentes a traumatismo*: galinha 5; canário 2; total 7

ESQUELETO E APARELHO LOCOMOTOR

(81 casos; 0,45%)

1. *Ossos*
   - 1.1 Fraturas: galinha 12
   - 1.2 Luxação da coxa: galinha 1
   - 1.3 Osteíte: galinha 5
   - 1.4 Atrofia óssea na região supra orbitária: galinha 1
2. *Articulações* (em geral tíbio-társica)
   - 2.1 Artrite: galinha 36; peru 6; pombo (asa) 1; faisão, corrupião e periquito, 1 de cada; total 46
3. *Músculos*
   - 3.1 Reumatismo: galinha 15
   - 3.2 Miosite intersticial: galinha 1

APARELHO URINÁRIO

(47 casos; 0,27%)

1. *Nefrite*, em geral intersticial: galinha 22; peru 2; marreco 2; pavão 1; total 27
2. *Glomerulonefrite*: galinha 5

3. *Glomerulo-túbulo-nefrite*: galinha 1
4. *Pielonefrite ascendente*: galinha 4
5. *Nefrose*: galinha 2; pato 1; total 3
6. *Degeneração parenquimatose do rim*: galinha e rolinha, 1 de cada; total 2
7. *Degeneração cística do rim*: galinha 1
8. *Atrofia renal* (desenvolvimento deficiente dos túbulos renais, restos do mesonefro; edema subcutâneo): galinha 1
9. *Agenesia do rim esquerdo* (2) *e direito* (1): galinha 3

APARELHO REPRODUTOR

(848 casos; 4,77%)

1. *Aparelho reprodutor masculino*

1.1 Hermafroditismo parcial em cisne preto, com dois testículos e um ovário, todos rudimentares 1

2. *Aparelho reprodutor feminino*

2.1 Ooforite (associada em três casos a hemorragia e em um a hematoma): galinha 219; peru, marreco, faisão, macuco e inhambu, 1 de cada; total 224
2.2 Degeneração cística do ovário, hemorrágica em 3, não hemorrágica em 2 casos: galinha 5
2.3 Abcessos do ovário: galinha 1
2.4 Peritonite por derramamento de gema na cavidade peritonial: galinha 376; peru 6; pato 5; faisão 3; ganso, pombo, marreco, macuco e perdiz chucra, 1 de cada; total 395
2.5 Peritonite devida a retenção da gema no oviduto: galinha 106; pato 2; peru 1; total 109
1.6 Peritonite devida a retenção de ôvo no oviduto: galinha 24; marreco 1; total 25
2.7 Peritonite devida a ruptura do oviduto (num caso com hemorragia interna): galinha 12
2.8 Oclusão do oviduto (associada a peritonite em 5 casos): galinha 29; arara, macuco, pato, canário e peru, 1 de cada; total 34
2.9 Ovidutite: galinha 3
2.10 Angiomatose do oviduto, com grandes cistos sanguineos: galinha 1
2.11 Hemorragia do oviduto: galinha 1

2.12 Duplicidade do oviduto (num caso ambos são igualmente desenvolvidos); galinha 2
2.13 Prolapso do oviduto: galinha 27
2.14 Anomalias dos ovos:
a) ôvo de duas cascas: galinha 1
b) ôvo excepcionalmente grande (105 g), formado dum ôvo normal (55 g), no interior do outro ôvo completo: galinha 1
c) ôvo de galinha com gema esverdeada, por excesso de farelo de algodão na ração 5
d) ôvo de galinha com *Ascarídia* no seu interior 1

PELE, FÂNEROS E TECIDO SUBCUTÂNEO

(160 casos; 0,9%)

1. *Hemorragia do tecido subcutâneo*: galinha 4; canário e papagaio, 1 de cada; total 6
2. *Edema subcutâneo* (em 2 casos associados a lesões renais): galinha 12; canário 1; total 13
3. *Edema na base das penas:* corrupião 1
4. *Edema da barbela* (às vêzes associado à cólera, estafilococo ou coriza): galinha 26; peru 1; total 27
5. *Necrose da barbela*: galinha 3
6. *Hematoma da barbela*: galinha 2
7. *Eczema da cabeça e pescoço*: galinha 1
8. *Processos inflamatorios da pele e tecido subcutâneo*: galinha 12; *pintassilgo* 1 (*) 13
9. *Esparavão*: galinha 85; peru 3; pato, faisão e canário, 1 de cada; total 91
10. *Ferimento do tarso* (com inflamação subseqüente): galinha 1
11. *Queimadura* por água quente com formação de flictenas na pele, às vêzes, confluentes: galinha 1
12. *Corrosão* da pele pela potassa: pinto 1

SISTEMA NERVOSO

(92 casos; 0,51%)

1. *Paralisia*, em geral das patas: galinha 53; pato 8; pombo, papagaio, peru, periquito e araponga, 1 de cada; total 66

(*) Êstes processos por vêzes atingem apreciável tamanho e formam nódulos de aspecto tumoral, devendo-se salientar a freqüência com que reações dêsse gênero, em aves, assumem aspecto de tumor. A estrutura revela tecido de granulação ou reação fibromatosa com infiltração de células redondas do tipo linfóide.

2. *Torcicolo* (em 1 caso associado a otite e noutro, acentuadíssimo, ligado a congestão cerebral e presença de material fíbrinoso entre encéfalo e dura mater): galinha 19; perdiz 2; pato 2; pombo 1 24
3. *Mielite* (lesões do corno anterior): galinha 1
4. *Encefalite* com paralisia do pescoço e asas: pombo 1

ÓRGÃOS DOS SENTIDOS

(21 casos; 0,11%)

1. *Otite*: galinha e peru 2
2. *Oftalmia*: galinha 8
3. *Queratite*: pinto 2; pato 1 3
4. *Úlcera* da córnea: pinto (*) 2
5. *Uveíte*: galinha (*) 2
6. *Blefarite*: pássaro não identificado, pombo e galinha 3
7. *Hemorragia intraocular*: canário 1

I. VÍCIOS

(28 casos; 0,15%)

1. *Canibalismo*: galinha 28

J. ENVENENAMENTOS

(41 casos 0,23%)

1. *Arsênico*: galinha 17; pombo 4; rolinha 2; pato e inhambu, 1 de cada; total 25
2. *Cianeto*: galinha 1
3. *Monóxido de carbono*: galinha 3
4. *DDT* (sintomas nervosos, tremor e mortalidade até 50%): canário 4
5. *Causas não apuradas*: galinha 6
6. *Intoxicação pela cal*: pinto (**) 2

K. PATOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO

(6 casos, 0,03%)

1. *Monstruosidade* (caracterizada pela ausência de penas e asas e hipertrofia da lamina inferior do bico): pinto 1

(*) Não se acham aquí incluídos os casos de queratomicose aspergilica, nem os de linfomatose ocular.

(**) Êste caso foi particularmente interessante, pois em pouco tempo morrem 500 pintos, depois de terem nascido normalmente e passado bem os primeiros dias. Depois começam a entristecer e vão morrendo um a um, com sinais de tristeza e asa caída. A necrópsia revela zonas de necrose no fígado, congestão pulmonar, rins aumentados e infiltrados, com grandes manchas brancas; na moela há placas rugosas de proliferação da mucosa, na passagem para o proventriculo; os ureteres estão dilatados e repletos de uratos. O exame histológico revela nefrose, degeneração gordurosa do fígado e úlcera de coagulação da moela.

A origem da intoxicação está na cal não bem extinta colocada por baixo da palha do piso; os pequenos fragmentos de cal não extinta eram procurados àvidamente pelos pintos, por causa de sua forma granulosa; êles ciscavam a palha, até desenterrar os fragmentos de cal. O exame químico do conteúdo da moela revelou-se fortemente positivo para cal.

2. *Cegueira congênita*: peru 1
3. *Polimelia*: galinha (*) 4

AN ANALYSIS OF 17,753 CASES OF AVIAN DISEASES IN SÃO PAULO

Abstract

From 1933 to 1953, inclusive, a careful record was made of the autopsies and diagnoses at the Poultry Diseases Department of the Instituto Biológico. During this period of 23 years 32,666 examinations were made, which resulted in 17,753 diagnoses, the analysis of which is here presented.

(*) Num dêstes casos, a perna esquerda é dupla em toda a extensão, apresentando o membro acessório, ainda, duplicidade do tarso, incompleta. As duas pernas estão abrangidas pela mesma pele, porém separadas por dentro: os músculos não são duplicados, inserindo-se ora numa ora noutra perna. No segundo caso, há pernas, sendo 2 normais e a terceira menor que não atinge o solo. No terceiro caso, destaca-se uma terceira perna do femur esquerdo. No quarto, há pernas e 2 ânus na cloaca.

Vol. 22 — Artigo 14 Dezembro de 1955

ESTUDOS SÔBRE A LEPROSE DOS CITRUS
I — DISTRIBUIÇÃO GEOGRAFICA E SINTOMATOLOGIA

POR

A. A. Bitancourt

Do Instituto Biológico de S. Paulo

com as estampas 17-23

A leprose é uma das principais doenças da laranjeira doce no Estado de São Paulo. Desfigurando as frutas ela pode reduzir consideravelmente o valor mercantil da produção dos pomares fortemente atacados. A leprose também produz lesões extensas e profundas dos ramos e galhos cuja morte provoca direta ou indiretamente. Desta forma a doença pode, nos casos mais graves, causar o definhamento e mesmo a morte de árvores inteiras.

De 1933 a 1946 realizei uma série de estudos sôbre a sintomatologia, transmissão natural às fôlhas e às frutas e combate à leprose dos Citrus. Notas preliminares sôbre resultados parciais dêsses estudos foram publicadas em diversas ocasiões (BITANCOURT 1934b, 1935, 1937, 1938, 1940a, 1941, 1943). Motivos supervenientes, — entre os quais o grande desinteresse pela citricultura que se verificou em consequência da segunda guerra mundial, — impediram a publicação dos resultados completos desses estudos. Recentemente entretanto, a citricultura de São Paulo vem passando por um notavel período de ressurgimento. Com o reinicio da exportação para o exterior e principalmente com o aumento considerável da procura pelas frutas cítricas nos mercados internos, os preços dessas frutas voltaram a ser remuneradores o que motivou o reaparecimento do interesse pela citricultura. Numerosos pomares foram plantados nestes últimos anos e os citricultores voltaram a se preocupar com as pragas e as doenças, solicitando informações sôbre os métodos de combate. Estes fatos me parecem suficientes para justificar agora a publicação por extenso, apesar do grande atraso, dos resultados dos estudos que realizei anteriormente à segunda guerra mundial, sôbre a leprose dos Citrus.

O presente trabalho é o primeiro de uma série de 4 publicações e versa sôbre a distribuição geográfica da leprose, — baseada de um lado sôbre especimens do herbário da secção de Fitopatologia, e de outro sôbre a literatura que pude consultar, — e sôbre os sintomas da doença nos galhos, fôlhas e frutos, igualmente baseados nos mesmos especimens assim como sôbre a coleção fotográfica da mesma secção. A distribuição geográfica sendo dada na ordem cro-

nológica dos trabalhos que a assinalaram nas diferentes partes do continente americano, constitui igualmente uma introdução histórica à presente série de trabalhos. As três publicações seguintes desta série versarão respectivamente sôbre a transmissão natural às fôlhas (BITANCOURT 1955a), a transmissão natural às frutas (BITANCOURT 1955b) e sôbre experiências de tratamento (BITANCOURT 1955c).

Para a identificação da leprose em São Paulo em 1932, contei com a desinteressada colaboração do falecido Professor HOWARD S. FAWCETT que examinou os especimens que lhe mandei, enviando outros dos Estados Unidos, assim como material fotográfico. O Dr. A. S. RHOADS também auxiliou na identificação dos especimens e contribuiu com duas fotografias, utilizadas no presente trabalho. Um grande número de especimens citados no presente trabalho foram contribuidos por diversos correspondentes e notadamente pelo Dr. J. DESLANDES. A tôdas estas pessoas consigno com prazer os meus agradecimentos.

HISTÓRICO E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Segundo FAWCETT (1911) a leprose teria sido assinalada pela primeira vez nos Proceedings of the Florida Horticultural Society de 1901 por H. H. HUME que se refere a uma nova doença da laranjeira cuja descrição coincide bem com as lesões de leprose nos galhos. Na mesma publicação, P. H. ROLFS, em 1905, refere-se à leprose sob o nome comum usado na Florida. Naquele Estado americano a doença é desde aquela época conhecida como *scaly bark* que alude aos sintomas da casca dos galhos e ramos. As lesões das frutas são geralmente designadas por *nail-head rust*. Ainda de acôrdo com FAWCETT a doença foi descrita no relatório anual da Estação Experimental da Florida em 1907, nos Proceedings of the Florida State Horticultural Society em 1908 e 1909 e no boletim n.º 98 da Estação Experimental em 1909.

A leprose continou a ocupar os fitopatologistas da Florida (FAWCETT 1911, ROLFS, FAWCETT e FLOYD 1911) que tinham iniciado o seu estudo em 1906. FAWCETT e BURGER (1911) pensaram ter demonstrado que a doença era causada pelo fungo *Cladosporium* (PERS.) LK. var *citricolum* FAWC. e em 1915 FAWCETT publicou um trabalho comparando as doenças dos Citrus na Flórida, California e Cuba, da qual se depreende que a leprose não existia nas duas últimas regiões.

Na publicação de 1911 acima citada e nas duas edições de seu trabalho sôbre as doenças dos Citrus (FAWCETT & LEE 1926,

FAWCETT 1936) FAWCETT indica a distribuição então conhecida da leprose. Em 1926, fóra da Florida a leprose sómente era conhecida no sul da China e nas Filipinas. A "lepra explosiva" de SPEGAZZINI (1920), de que falarei adiante, encontrada no Paraguay em 1919, não era então considerada idêntica à leprose. Na segunda edição de seu tratado, em 1936, entretanto, FAWCETT indica que a lepra explosiva parece ter as mesmas características que a leprose. Ele estende a distribuição geográfica da doença ao norte da India, Ceilão, Java, Japão, Baixo Egito, Africa do Sul e Brasil. Para o nosso país FAWCETT se baseia nas minhas publicações, conforme veremos adiante.

Na Florida a leprose parece ter sido uma doença grave sòmente na península da costa oeste que constitui o condado de Pinellas. Foi, entretanto, também assinalada em pomares isolados em outros condados, todos êles situados entre 27 e 29 graus de latitude norte. Durante alguns anos a leprose parece ter preocupado as autoridades, conforme se pode ver nos relatorios anuais da estação experimental da Florida entre 1923 e 1927 (BURGER 1923, 1924, 1925, 1926 e 1927). Em 1925 as prescrições de quarentena relativas à leprose foram revistas (ANÔNIMO 1925). De acôrdo com essas prescrições não recebem certificados as mudas de viveiros em que a doença tenha sido observada nos últimos 6 meses e as mudas vizinhas de árvores doentes. No seu folheto sôbre as doenças dos Citrus na Florida, RHOADS e DEBUSK (1931) consagraram algumas páginas à leprose que ilustram com fotografias. Posteriormente a leprose parece ter desaparecido progressivamente dos pomares da Florida, o que foi atribuido ao contrôle da doença pelos bons tratos culturais, poda dos galhos secos e pulverizações contra outras doenças e pragas (KNORR & DUCHARME 1951b). Por este motivo de 1931 a 1939 não se encontra na literatura qualquer trabalho relativo a essa doença nos Estados Unidos. Naquele ano, FAWCETT e RHOADS (1939) publicaram uma curta nota sôbre lesões semelhantes à leprose nos galhos e ramos menores de *Quercus laurifolia* MICHX. Em seguida às suas observações sôbre a leprose dos Citrus na Argentina, KNORR e DUCHARME (DUCHARME & KNORR 1950, KNORR & DUCHARME 1951a) voltaram a sua atenção para a ocorrência dessa doença na Florida, confirmando KNORR (1950) para essa região, os resultados de FREZZI (1940) e de VERGANI (1945) na Argentina, que demonstraram as relações da leprose com o ácaro *Tenuipalpus* (*Brevipalpus*) *pseudocuneatus* BLANCH., vetor ou talvez mesmo agente causal direto da doença. Fóra da Florida a leprose nos Estados Unidos sòmente foi assinalada no Estado de Mississippi (ANÔNIMO 1923).

No Mexico, em visitas que fiz a pomares da região de Cuautepec, Vera Cruz, em 1942 e na de Valle, San Luis Potosí, em 1950, não encontrei leprose, mas segundo informação de A. S. RHOADS (1), a estação experimental de Florida tinha recebido exemplares procedentes daquele país.

Na America do Sul a leprose foi assinalada pela primeira vez por SPEGAZZINI (1920) numa publicação sôbre as doenças dos Citrus por êle observadas no Paraguay em 1919. SPEGAZZINI, que provavelmente não tinha conhecimento da ocorrência da leprose na Florida, designou a doença que observara por "lepra explosiva", uma notavel coincidência na nomenclatura fitopatológica. A identidade da leprose e da lepra explosiva foi entretanto constatada desde 1937 por FAWCETT e BITANCOURT (FAWCETT 1937) na sua excursão pelo Paraguay e a Argentina (FAWCETT & BITANCOURT 1940 a, FAWCETT & BITANCOURT 1949), o que também aconteceu com MARCHIONATTO em 1927 quando observou a doença pela primeira vez (MARCHIONATTO 1950). Em 1951 KNORR e DUCHARME (1951a) mostraram as semelhanças e diferenças entre a leprose e a lepra explosiva e concluiram, como os autores anteriores, que se tratava da mesma doença. Propuzeram que fosse utilizado o nome único de leprose, o que aliás já vinha sendo feito nos trabalhos de FAWCETT e BITANCOURT acima citados (BITANCOURT 1940a).

No seu trabalho, SPEGAZZINI (1920) descreve as lesões nos galhos e no tronco, onde, segundo afirma, elas possuem 20 × 5 cm. Acredito que neste caso ele tenha confundido a leprose com a psorose que existe também nos pomares do Paraguay e da Argentina (FAWCETT e BITANCOURT 1940a, 1949). O qualificativo de "explosivo" dado por SPEGAZZINI aplica-se, aliás, muito melhor a certas formas de psorose que observamos no Paraguay e na Argentina, do que à leprose propriamente dita. As lesões das frutas nem siquer são mencionadas por SPEGAZZINI e quanto às fôlhas, os sintomas por êle assinalados não são as manchas típicas causadas por esta doença. Sem dúvida SPEGAZZINI não soube relacionar as lesões dos galhos com as das fôlhas e das frutas que deviam estar presentes nas árvores doentes do Paraguay que êle observou.

A leprose parece ter sido assinalada pela primeira vez em publicações na Argentina por ZEMAN (1932), sob o nome de lepra explosiva. Vimos entretanto que MARCHIONATTO (1950) já a observara em 1927 e sem dúvida a doença deve ter sido mencionada em relatórios oficiais anteriormente à publicação de ZEMAN que afirma

(1) Carta de 5-4-33

ter localizado alguns focos isolados no norte da provincia de Corrientes em 1921 e na provincia de Entre Rios em 1922. Em 1925 a doença foi reconhecida nas ilhas do Delta e ZEMAN conclui que em 5 anos a doença tinha avançado do Paraguay até Buenos Aires. Esta conclusão ,entretanto, deve ser tomada com caução pois a propagação poderia ter sido tão sòmente aparente, resultando simplesmente da identificação tardia da doença ao sul de Corrientes. Convém frizar que FAWCETT e BITANCOURT em cuidadosas observações nos pomares das principais regiões citrícolas argentinas em 1937, não observaram caso algum de leprose ao sul de Monte Caseros, provincia de Corrientes (FAWCETT 1937). De fato, sòmente nessa provincia e mais ao norte, no territorio de Missiones, encontraram a leprose, quase sempre com carater muito grave. Suas demoradas inspecções em pomares de Entre Rios, Delta do Paraná e Tucuman, assim como as de FAWCETT em Salto e de BITANCOURT em Montevideo, no Uruguay (FAWCETT e BITANCOURT 1940b) além da observação de laranjas postas à venda nos mercados locais, nunca revelaram a presença de leprose nessas regiões. Não se pode evitar de pensar que a psorose pode ter sido confundida com a leprose, uma vez que a primeira doença existe em outras provincias, além de Corrientes.

Contrariamente a SPEGAZZINI, ZEMAN soube relacionar os sintomas dos galhos com os das frutas e das fôlhas, que descreve com precisão.

Depois de ZEMAN, a leprose é tratada na literatura argentina em breves notas de MARCHIONATTO (1935, 1938) e nos acima citados trabalhos de FREZZI (1940) e VERGANI (1945). FREZZI assinala a sua ocorrência, além das provincias e do territorio já mencionados, nos territórios do Chaco e de Formosa, e ao norte da provincia de Santa Fé.

As já citadas observações de FAWCETT e BITANCOURT na Argentina, durante sua viagem de 1937, foram objeto de um relatorio apresentado no mesmo ano às autoridades argentinas e de um artigo de FAWCETT (1937), mas só foram publicadas *in extenso* em 1949. Eles observaram fortes ataques de leprose nas laranjeiras doces subespontaneas que crescem nas matas ao longo do Rio Paraná e em torno das ruinas das missões jesuitas na provincia de Corrientes e no territorio de Misiones (FAWCETT 1937). KNORR e DUCHARME (1951a) relataram suas observações sôbre a leprose na Argentina, comparando-as com as que fizeram na Florida.

No Brasil tive a atenção chamada sôbre a leprose quando, em 1931, iniciei meus estudos sôbre as doenças dos Citrus (BITANCOURT,

FONSECA e AUTUORI 1933, BITANCOURT 1934a). O primeiro especimen arquivado na secção de Fitopatologia data de 1 de junho de 1931 e consta de fôlhas de laranjeira doce da variedade Bahia, procedentes de Sorocaba, Estado de São Paulo, com manchas típicas das fôlhas. Este especimen foi seguido de muitos outros. A ausência na literatura, de qualquer descrição dos sintomas da leprose nas fôlhas, muito raros na Florida (FAWCETT 1911, FAWCETT e LEE 1926) não permitiu que eu identificasse imediatamente a doença de São Paulo com a dos Estados Unidos. Achei-a parecida com o *concentric ring blotch* da Africa do Sul (DOIDGE e VAN DER PLANK 1930) mas o exame de especimens dessa doença recebidos do Transvaal me convenceu do contrario. Passei então a considerar a doença de São Paulo como nova, dando-lhe o nome de "variola" devido aos sintomas característicos da casca da fruta. Em seguida a uma troca de correspondencia, especimens de herbario e fotografias com H. S. FAWCETT, então professor da Universidade de California, em Riverside, e A. S. RHOADS, então fitopatologista da Estação Experimental Agricola da Universidade de Florida, em 1932 e 1933, ficou definitivamente estabelecido que a "variola" era a doença conhecida na Florida por *nail head rust* ou *scaly bark* e designada por FAWCETT e LEE em seu tratado (1926) por leprosis. Reconhecemos, entretanto, que a leprose em São Paulo e na Florida apresentava algumas diferenças, principalmente no que diz respeito às manchas das fôlhas, raras na Florida e comuns em São Paulo e as lesões dos galhos que caracterizam a doença nos Estados Unidos ao passo que podem faltar completamente nas plantas atacadas em São Paulo.

No Brasil, a leprose foi mais tarde assinalada em Jacarepaguá, Distrito Federal, Ouro Preto, Minas Gerais (BITANCOURT, FONSECA e AUTUORI 1933), em Morro Velho, Lavras, Volta Grande e Itajubá, Minas Gerais (FAWCETT e MULLER 1936) e em muitos pomares do Rio Grande do Sul, principalmente ao longo do Rio Uruguay (FAWCETT e BITANCOURT 1937). A ocorrencia da doença no Distrito Federal não foi confirmada posteriormente e é hoje posta em dúvida (BITANCOURT 1940a). Considero hoje como simples modalidades da leprose as doenças mencionadas por FAWCETT e BITANCOURT sob os nomes de ciclose (FAWCETT 1937) e de ombrose (FAWCETT & BITANCOURT 1937) em Minas Gerais e São Paulo. Nos pomares de Pernambuco e Bahia, FAWCETT e BITANCOURT (1937) não encontraram a leprose. No herbário da Secção de Fitopatologia há especimens de leprose do Municipio de Uruçuí, Piauí, e de Belem, Pará. OLIVEIRA (1946) assinala a doença em Crato, Ceará.

Em outros paises da America Latina, sòmente na Bolivia parece ocorrer a leprose. Frutas com as manchas características da doença foram interceptadas nos Estados Unidos pelos serviços de vigilância fitossanitária (ANÔNIMO 1952). Não encontrei a leprose nos pomares experimentais de Estação Experimental de Palmyra, Colombia, que visitei em 1950. ARENTSEN que conhecia a leprose por a ter observada em São Paulo poucos anos antes, não a constatou nos pomares do Chile que examinou (ARENTSEN 1945).

SINTOMATOLOGIA

Os sintomas de leprose variam de acôrdo com os seguintes fatores:

1.º Espécie ou variedade do hospedeiro;
2.º Localidade, região ou país;
3.º Fase de desenvolvimento do orgão afetado, no momento da infecção.

E' provavel, igualmente, que as diferenças observadas nos sintomas de leprose numa mesma espécie ou variedade do hospedeiro, de acôrdo com a localidade, ou mesmo dentro de uma mesma localidade, sejam devidas à ocorrência de mais de uma estirpe do agente da doença. Isto poderia explicar, por exemplo, que na Florida a leprose ataca principalmente os galhos e as frutas, sendo raras as manchas das fôlhas, ao passo que em São Paulo dá-se o contrário, sendo as manchas das fôlhas o sintoma mais comum e mais característico. A semelhança de sintomas em hospedeiros diferentes, como a laranjeira doce e a tangerineira, que se observam em regiões diferentes, com sintomas locais, — como acontece no Paraguay e na Argentina por exemplo, — também se explica si se admitir que as estirpes do agente da leprose causadoras desses sintomas nos dois paises são diferentes.

Tratarei em primeiro lugar dos sintomas de leprose na laranjeira doce (*Citrus sinensis* OSB.), o hospedeiro da doença mais comum e fortemente atacado e também o que, em consequência da leprose, sofre os prejuizos de maior importância econômica. Na ignorância em que nos achamos relativamente às diferentes estirpes do agente da leprose, porventura existentes, tratarei separadamente dos sintomas observados nas diferentes regiões ou paises em que a leprose foi constatada, salientando nos lugares oportunos, as semelhanças e diferenças que ocorrem entre essas diversas regiões.

A descrição dos sintomas da leprose que farei a seguir é principalmente baseada nos especimens de herbário e na coleção fotográ-

fica da Secção de Fitopatologia. O número sob o qual estes especimens estão catalogados no herbário está indicado, precedido do prefixo IB, nos casos em que o especimen tem interesse especial.

Laranjeira doce

São Paulo: No Estado de São Paulo a leprose apresenta-se, na maioria dos casos, com sintomas bastante uniformes nas fôlhas, frutas e mais raramente nos galhos. Nas fôlhas as manchas medem de 4 a 12 mm e parecem resultar da formação de goma no seio dos tecidos das fôlhas, em áreas mais ou menos arredondadas, às vezes alongadas no sentido das nervuras secundárias. Estas manchas são ligeiramente salientes na página inferior da fôlha e lisas na página superior, com coloração verde pálida no centro e amarela na periferia. A zona amarela é translucida formando como um halo em torno do centro escuro, sendo o conjunto muito caracteristico quando visto à contraluz (Est. 17, E). As árvores muito atacadas podem, dessa forma ser identificadas de longe, quando vistas entre o sol e o observador. Nas manchas mais velhas o centro se torna mais escuro e as maiores apresentam com frequência aneis concentricos escuros, alternando com aneis claros (Est. 17, D). Finalmente os tecidos se necrosam, secam e tomam uma coloração parda. Estas zonas secas, ligeiramente deprimidas, estão a principio localizadas nos aneis concentricos escuros, que acentuam. Os tecidos secos são facilmente invadidos por fungos saprofitas ou parasitas fracos que estendem a lesão, a qual apresenta então os caracteres proprios do parasita que a invadiu. E' muito frequente, por exemplo, verificar a mancha de antracnose produzida pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. se superpor mais ou menos completamente à mancha de leprose nas fôlhas (Est. 19, A). A preferência marcada do ácaro da "ferrugem" dos Citrus (*Phyllocoptruta oleivora*) pelos tecidos cloróticos faz com que êle procure as manchas de leprose na face inferior das fôlhas. Tais manchas apresentam então a coloração de ferrugem característica dos tecidos danificados pelo ácaro.

Estes caracteres podem se apresentar com ligeiras diferenças em diferentes variedades de laranjeira doce. Assim, numa experiência sôbre a transmissão natural da leprose a fôlhas de laranjeira doce das variedades Pera e Bahia (BITANCOURT 1955a), as lesões na primeira variedade eram menores, arredondadas, e mais escuras que na segunda, em consequência de uma necrose mais acentuada do limbo (Est. 17, A). Na laranjeira Bahia as lesões eram maiores, mais alongadas, menos necróticas, e apresentavam linhas concentricas mais escuras (Est. 17, B).

Nas laranjas as manchas começam a aparecer quando a fruta mede de 4 a 5 cm de diâmetro, na forma de uma pequena mancha amarela com centro mais escuro. Esta mancha aumenta de diâmetro até alcançar pouco menos de 1 cm. Apresenta-se então com um centro verde sujo e uma aureola amarela em volta (Est. 18, A). Na parte central as bolsas secretoras são visíveis como pequenas papilas salientes, redondas, de côr mais clara. A medida que a fruta amadurece a aureola amarela, a principio bem destacada do verde escuro da casca sã, confunde-se com esta que passa para a côr amarela e em seguida laranja, da fruta madura. O centro verde torna-se pardo a principio e em seguida marrom escuro, até preto (Est. 18, B). Na fruta completamente madura a mancha mostra-se como uma depressão da casca, com 5 a 10 mm de diâmetro, de côr uniformemente marrom escura ou preta. As bolsas secretoras não constituem mais pequenas papilas salientes e sim pelo contrário, pequenas depressões, devido ao desaparecimento de seu conteúdo e subsequente colapso dos tecidos (Est. 18, C). As manchas são mais ou menos uniformemente distribuidas em tôda a superfície da fruta, mas podem ocasionalmente achar-se reunidas quase que exclusivamente num dos lados do orgão atacado (Est. 23, C).

Raramente, em São Paulo, as manchas de leprose nas frutas apresentam-se no inicio da maturação com um anel escuro e centro marcado por um ponto preto (Est. 19, B). As frutas com manchas de leprose amadurecem mais rapidamente que as frutas sem manchas. A esta maturação antecipada segue-se uma queda prematura das frutas, sendo característica, no início da safra, a presença de muitas frutas caídas ao redor do pé das laranjeiras fortemente atacadas de leprose.

Nos galhos, conforme dissemos, as lesões de leprose são bastante raras em São Paulo. Quando elas ocorrem, começam como pequenas manchas, ligeiramente salientes, lisas, arredondadas, de coloração amarela ou verde pálida. Estas manchas têm mais ou menos a aparência de uma leve entumescência produzida pela formação de goma nos tecidos por baixo da epiderme. Em geral é possível constatar uma disposição mais ou menos concentrica na referida mancha (Est. 18, D). Posteriormente os tecidos alteram-se mais profundamente e a coloração torna-se marrom-avermelhada ou chocolate. Muitas vezes o escurecimento da mancha não afeta a totalidade de sua área e sim um circulo ou um arco de circulo, em torno do centro que conserva a côr amarela ou verde do inicio. O circulo é, em regra, mais saliente do que o resto da mancha. Neste estado a lesão tem 5 a 20 mm de diametro, sendo geralmente alongada no sentido do

comprimento do galho. As lesões podem ser muito numerosas, havendo-as de todos os tamanhos na superfície de um mesmo galho, coalescendo muitas vezes em extensas zonas manchadas (Est. 18, E). Mais tarde os tecidos superficiais das zonas das lesões mais intensamente alteradas e de côr marrom, secam e às vezes racham e se destacam em pequenas escamas. Outras vezes as lesões mudam simplesmente de côr na parte mais central, tornando-se cinzentas ou pardas-claras, rachando-se longitudinalmente várias vezes. Nos ramos e no tronco restam geralmente poucos vestigios das lesões que sòmente se originam nos galhos ou partes verdes do vegetal e, por descamação e formação de novos tecidos, vão aos poucos desaparecendo. E' geralmente nos galhos de desenvolvimento rápido e de tecido mais tenro e aquoso como os "ladrões" que as lesões de leprose são as maiores, mais acentuadas e mais numerosas (Est. 19, C).

As figuras A, B e C da estampa 19 mostram as lesões em fôlha, fruta e galho, observadas em pés de laranjeira Bahia de um pomar de Piracicaba, Estado de São Paulo, em 1939. A fôlha tem manchas típicas, algumas fortemente necrosadas no centro, devido à invasão por fungos parasitas secundários. A fruta da fig. B, no inicio da maturação, apresenta manchas anulares, com centro constituido por um ponto escuro e anel escuro periférico, um tipo pouco usual em São Paulo, e o galho da fig. C tem lesões grandes e salientes, de um tipo comum em "ladrões".

Raramente as lesões de leprose em laranjeira doce, em São Paulo, afastam-se do que acaba de ser descrito. Lesões maiores das fôlhas podem, entretanto, ser observadas em especimens da Cantareira (IB 4139) onde certas manchas alcançam 16 mm de diametro, da Capital (IB 2027) que têm 15 x 30 mm e mesmo mais (Est. 17, C) e Jacareí (IB 1948), com 15 x 25 mm. O exemplar da Capital apresenta em algumas manchas, na face superior das fôlhas, as manchinhas salientes de goma escura, que caracterisam a leprose em outras regiões do Brasil e na Argentina e que, nos casos mais acentuados, foram designadas por "ciclose", conforme veremos adiante. A existência em São Paulo desses tipos de manchas de leprose das fôlhas, diferentes do tipo mais usual, parece indicar a presença de mais de uma estirpe do agente dessa doença neste Estado. Convém observar, entretanto, que em experiências sôbre a transmissão natural da leprose às fôlhas (BITANCOURT 1955a) manchas grandes do tipo do especimen da Capital acima citado e apresentadas na Est. 17 C, foram produzidas na variedade Lisa Paulista, ao passo que as outras variedades de laranjeira doce expostas à contaminação em condições idênticas, apresentavam manchas do tipo comum. Neste

caso, sem dúvida, as diferenças observadas dependiam da reação da variedade citrica, isto é do hospedeiro, e não de estirpes diferentes do agente da doença.

Em galhos, lesões grandes podem igualmente ser observadas em especimens de Sorocaba (IB 779), Limeira (IB 1002), Amparo (IB 4593) e São Bento (IB 4670). Neste último caso algumas lesões alcançam as dimensões de 20 x 40 cm e apresentam aneis concentricos muito salientes, com descamação acentuada.

Outros Estados brasileiros: Fóra do Estado de São Paulo temos exemplares de leprose na laranjeira doce dos Estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Pará e Piauí. Em Minas Gerais a leprose apresenta-se com os mesmos caracteres que em São Paulo nas fôlhas (Lavras, IB 2475) e nos galhos (Lavras, IB 2340), ou mostra lesões grandes, como num especimen de laranjeira seleta de Araxá (IB 2229) onde as manchas das fôlhas alcançam 14 x 18 mm. Sob o nome de "ciclose", FAWCETT e BITANCOURT (FAWCETT 1937) designaram uma forma de leprose em fôlhas de laranjeira Bahia provenientes de Lavras (IB 2083) caracterizada por manchas semelhantes ao tipo mais comum na Argentina e que será descrito abaixo. Estas manchas são de tamanho medio e apresentam, na face superior da fôlha, geralmente a meia distancia entre o centro e a periferia numerosas manchinhas salientes, irregulares, alongadas, com aparência de diminutos pingos de açucar queimado, formando um desenho finamente pontilhado, as mais internas, de coloração parda escura, vagamente dispostas segundo aneis concentricos, as mais externas, pelo contrário, dispostas radialmente e de côr mais clara, quase amarela. Em fôlhas de laranjeira Pera da mesma procedência (IB 2474) as manchas são muito menores e apresentam poucas dessas manchinhas escuras, na sua parte mediana.

Do Estado do Pará temos um exemplar de galhos (IB 2942) que apresentam lesões grandes (15-25 mm), escamosas. Um exemplar do Estado do Piauí (IB 4975) apresenta fôlhas com manchas circulares cloróticas, alcançando no máximo 15 mm de diametro, sem sinal de necrose, e fôlhas com manchas de 8 a 30 mm de diametro cobertas de manchinhas escuras que a primeira vista poderiam se confundir com a da "ciclose" (Est. 20 B). Contrariamente às dos exemplares de Minas Gerais, entretanto estas manchas são visiveis nas duas faces das fôlhas e apresentam quando vistas com lupa de forte aumento, um aspecto diferente pois têm a superficie rasa e não abaulada como as de Minas. Em anotações que acompanham o especimen, C. R. GONÇALVES que o colheu, observa que as frutas da mesma árvore não apresentam lesões.

No Rio Grande do Sul a leprose produz lesões das fôlhas e dos galhos semelhantes às da vizinha provincia de Corrientes, na Argentina, e que serão descritas adiante. Num exemplar de Uruguayana (IB 2580) as manchas das fôlhas são de tamanho medio e algumas apresentam as manchinhas escuras dispostas concentricamente, que caracterizam a "ciclose". As lesões dos galhos são grandes, alcançando até 50 mm no sentido longitudinal. Elas têm um centro plano, de grandes dimensões, e vários aneis concentricos, salientes, escamosos.

Outros Paises: Na Argentina, na provincia de Corrientes, a leprose na laranjeira doce é uma doença muito mais grave do que no Estado de S. Paulo, pois apresenta, em regra, sintomas mais acentuados. As manchas das fôlhas são grandes, alcançando em alguns casos 35 x 40 mm (IB 2581, Est. 20, C) e quase sempre apresentam na face superior as manchinhas pardas escuras, salientes, dispostas concentricamente (IB 2591, Est. 20, D), mencionadas acima para o exemplar de Lavras, Minas Gerais, descrito sob o nome de "ciclose". Estas manchinhas são raramente vistas na página inferior das fôlhas.

Numa laranjeira de pé franco na estação ferroviária de San Roque, provincia de Corrientes, observei um tipo pouco usual de manchas de leprose das fôlhas, caracterizadas por serem pequenas, arredondadas, com aneis concentricos alternadamente claros e escuros (IB 2584, Est. 20, A). Estas manchas apresentam alguma analogia com as manchas de *ring-blotch* (BITANCOURT 1935), mas delas se diferenciam por serem visíveis em ambas as faces das fôlhas e não sòmente na face superior.

Nos galhos as lesões são usualmente do tipo maior, descrito acima em relação aos especimens de São Paulo, Pará e Rio Grande do Sul. Estas lesões, na provincia de Corrientes, podem ser tão numerosas que cobrem a quase totalidade dos galhos das árvores doentes. A descamação intensa das lesões e a sua invasão por fungos parasitas secundários como *Colletotrichum gloeosporioides*, acarretam a morte dos galhos afetados o que pode eventualmente conduzir à morte da árvore toda. KNORR e DUCHARME (1951a) descrevem e representam lesões enormes dos ramos e mesmo do tronco que atribuem à leprose, na Argentina. A vista, porém, da semelhança das lesões de psorose B (FAWCETT e BITANCOURT 1943) com as de leprose, há possibilidade das lesões descritas por KNORR e DUCHARME serem da primeira e não da segunda doença.

Também nas frutas, as lesões de leprose, na Argentina, são maiores e mais acentuadas que em São Paulo. Em vez das pequenas manchas arredondadas que se observam aqui, a doença causa nas frutas verdes manchas escuras grandes que podem alcançar até 20 mm de diametro (Est. 21, A) e, nas frutas maduras, manchas deprimidas, quase pretas, muito irregulares, que resultam da necrose de parte sòmente das manchas observadas na fruta verde e que não raro afetam o aspecto de circulos ou arcos de circulo (Est. 21, B e D). Como resultado dessas lesões as frutas ficam muito desfiguradas e até deformadas (Est. 21, E), amadurecem prematuramente e caem das árvores em quantidade.

As lesões de leprose que observei nas fôlhas de laranjeira doce no Paraguay eram de um tipo um tanto diferente das que foram descritas acima, no Brasil e na Argentina. De tamanho pequeno ou médio, pois poucas passam de 10 mm de diametro, estas manchas têm superfície lustrosa e coloração amarela, aparentemente devido ao fato das células epidermicas em quase tôda a superfície da mancha estarem repletas de goma, salvo em pequenas áreas irregulares na periferia. No centro das manchas observam-se com frequência as manchinhas salientes, pardas escuras, mencionadas em relação às manchas das fôlhas de especimens de outras procedências (IB 2598 e 2600, Est. 20, E). O halo amarelo, em torno das manchas é frequentemente escurecido na página inferior, onde forma um anel escuro, talvez em consequência da ação do ácaro *Phyllocoptruta oleivora* (Ashm.) (Bitancourt 1940b). A esse tipo pouco usual de mancha das fôlhas correspondem manchas das frutas menos deprimidas e de coloração mais clara que as que se observam em especimens de outras regiões (IB 2598, Est. 23, B). As lesões dos galhos, entretanto, não diferem sensivelmente das que foram descritas acima para o Brasil e a Argentina. Sôbre as grandes lesões do tronco mencionadas por Spegazzini (1920) cabem os reparos feitos relativamente a tais lesões na Argentina, ou seja, que elas poderiam resultar da psorose e não da leprose.

Nos Estados Unidos a leprose sòmente ocorre na Florida e no Mississippi. Na Florida, as lesões das fôlhas, são, como já ficou dito, muito raras, mas quando ocorrem apresentam os caracteres das manchas das fôlhas como se observam em São Paulo (IB 5328). A leprose é, na Florida, principalmente uma doença dos galhos (IB 939,940) e das frutas da laranjeira doce onde os sintomas são muito semelhantes aos que já foram descritos acima para as regiões citricolas da America do Sul. Knorr e DuCharme (1951 b) descrevem

e representam lesões grandes do tronco, semelhantes às que êles assinalam para a Argentina e sôbre as quais cabem as observações que fiz acima para a Argentina e o Paraguay.

A leprose está quase extinta nos pomares da Florida. As pulverizações a que são submetidas as laranjeiras para combate aos insetos e ácaros parecem ter suprimido completamente a doença, salvo em pomares ou árvores isolados, abandonados, ou que não são tratados regularmente contra as pragas e doenças (KNORR e DUCHARME 1951b).

Observei na Florida um tipo de mancha das fôlhas extremamente parecido com as manchas de leprose (IB 3518). Na página inferior das fôlhas estas manchas são frequentemente escurecidas, aparentemente sob a ação dos ácaros da ferrugem das frutas cítricas (*Phyllocoptruta oleivora*). E' possível que tais manchas sejam os sintomas de deficiência de molibdeno descritos na Florida (STEWART & LEONARD 1952).

Não tive oportunidade de examinar especimens de leprose da laranjeira doce procedentes de outras regiões citricolas do mundo, mencionadas na literatura, e que são citadas no início do presente trabalho.

Outros hospedeiros

Conforme já foi dito acima, a leprose é principalmente uma doença da laranjeira doce. Diversas outras espécies cítricas, entretanto, apresentam lesões das fôlhas, galhos e frutas, semelhantes às da laranjeira doce e que sem dúvida têm a mesma causa. Estas lesões porém são, em geral, raras, e muito menos acentuadas do que na laranjeira doce.

Na Limeira da Persia (*Citrus aurantifolia* SW.) em São Paulo, a leprose produz manchas das fôlhas parecidas com as da laranjeira doce, de tamanho médio e bastante necrosadas no centro (IB 838, Est. 22, A). Nos galhos de um especimen de Rio Grande do Sul (IB 687), as lesões são grandes (até 30 mm de comprimento) e salientes. C. R. GONÇALVES, nas anotações sôbre um especimen de laranjeira doce do Piauí (IB 4975, ver acima) menciona que observou os mesmos sintomas em fôlhas de limeira da mesma localidade. OLIVEIRA (1946) assinala a doença nesse hospedeiro no Ceará.

No Limoeiro Galego (*Citrus aurantifolia* SW.) em São Paulo, as manchas das fôlhas são muito semelhantes às de tipo pequeno da laranjeira doce e pouco necrosadas (IB 830).

Da Laranjeira Azeda (*Citrus aurantium* L.) sòmente possuimos um exemplar de leprose proveniente do Estado do Pará (IB

2941). As manchas das fôlhas são grandes, até 20 mm de diâmetro, e possuem na face superior as manchinhas salientes, pardas escuras, do tipo "ciclose". Pelo seu aspecto essas manchas correspondem bem às lesões dos galhos de laranjeira doce colhidos na mesma localidade (IB 2942, ver acima). O único galho que acompanha as fôlhas do especimen IB 2941, entretanto, possue lesões muito menores, pouco conspicuas. Um exemplar de São Paulo apresenta manchas um tanto semelhantes às do Estado do Pará, porém maiores, mais irregulares e com disposição concentrica das manchinhas escuras (IB 795) e que por isto preferimos considerar como de clorose zonada (BITANCOURT e GRILLO 1934). Na Florida, segundo se depreende de uma fotografia de A. S. RHOADS (Est. 22, E), a leprose produz nas fôlhas de laranjeira azêda manchas semelhantes às das laranjeira doce.

No Limoeiro (*Citrus limonia* OSB.) a leprose produz em São Paulo, manchas das fôlhas em todo semelhantes às da laranjeira doce do tipo médio ou pequeno (IB 837, Est. 22, B; IB 901, 1967, 2682, 4138) e nas frutas elas são pequenas e semelhantes às da laranja doce (IB 901, 1967) ou bastante grandes, mais rasas e menos escuras (Est. 23, A). No Limão Ponderosa observei lesões fortemente deprimidas, exsudando goma de ferida, que parecem ser de leprose (Est. 21, C).

Na Cidreira (*Citrus medica* RISSO) a leprose produz em São Paulo manchas das fôlhas semelhantes às da laranja doce (IB 836, Est. 22, D). FAWCETT e BITANCOURT (1937) descreveram sob o nome de "ombrose" umas manchas das fôlhas de uma espécie de Citrus, possivelmente próxima da cidreira, muito parecidas com os casos extremos de leprose designados por "ciclose". São manchas grandes que trazem na página superior numerosas manchinhas salientes, pardas escuras, mais ou menos dispostas em círculos concentricos (IB 2359, Est. 22, G).

No Pomelo (*Citrus paradisi* MCF.) não observei em São Paulo lesões da leprose nas fôlhas, galhos ou frutas. Na Florida, entretanto, a doença parece causar manchas das fôlhas semelhantes às que produz em laranjeira doce, conforme se vê em uma fotografia de A. S. RHOADS (Est. 22, F). Em 1939 (IB 3519) e de novo em 1951 (IB 5775), colhí na Florida fôlhas de pomelo apresentando manchas ovaladas, grandes, amarelas (até 25 mm), às vezes com vaga disposição concêntrica e mais escuras na página inferior, provavelmente sob a ação do ácaro *Phyllocoptruta oleivora*. Estas manchas são semelhantes às que assinalei acima para a laranjeira doce, cujo

especimen foi colhido no mesmo lugar e possivelmente são também causadas por deficiência de molibdeno no solo.

Na Laranjeira Cravo (*Citrus reticulata* BLANCO) em São Paulo (IB 842) e nas diversas variedades de tangerineira, inclusive a mexeriqueira (*Citrus reticulata* BLANCO) a leprose produz manchas das fôlhas parecidas com as de laranjeira doce, quer do tipo pequeno (IB 842, Est. 22, C), quer do tipo médio com as maiores apresentando aneis concentricos (IB 775, 2362, 4195). Nas frutas as lesões são pequenas e parecidas com as da laranja doce (IB 2362). Na Argentina observei manchas de leprose nas fôlhas de duas tangerineiras vizinhas, a primeira com manchas pequenas, redondas, com, na página superior, um anel mais ou menos completo de manchinhas salientes, côr de tijolo (IB 3471), a segunda com manchas maiores, até 20 mm de diametro, com o mesmo anel de manchinhas, porém de côr mais escura (IB 3472). Estas manchas apresentam grande semelhança com o tipo de mancha das fôlhas da laranjeira doce mais comum na Argentina. No Paraguay observei manchas das fôlhas da tangerineira identicas às que descrevi acima para a laranjeira doce e portanto com características próprias, diferentes das encontradas em outros paises. As manchas, médias ou pequenas, têm coloração parda em toda a superfície, devido à alteração das células superficiais que se enchem de goma (IB 2616). Nas frutas, porém, as lesões são idênticas às da laranja doce (Est. 23, E). Na Louisiana, nos Estados Unidos, observei nas fôlhas de "tangerine", uma variedade de laranjeira cravo, manchas parecidas com as de leprose, porém de contorno mais irregular, muitas vezes limitadas lateralmente pelas nervuras secundárias, principalmente na página inferior onde esses limites são acentuados por uma linha irregular, de largura variavel, de tecidos necroticos, levemente salientes, de côr parda clara (IB 4466).

FAWCETT (1936) cita entre as espécies cítricas onde encontrei sintomas de leprose, o Rangpur Lime, ou seja o Limoeiro Cravo (*Citrus reticulata* var.). Como não possuo especimens ou anotações relativos a esse hospedeiro, acredito que a citação de FAWCETT resulta de uma confusão com a Laranjeira Cravo que acima mencionei.

Lesões dos galhos e das fôlhas, parecidas com as de leprose dos Citrus, são às vezes observadas em diversos hopedeiros de familias fanerogâmicas mais ou menos afastadas das Rutaceas. FAWCETT e RHOADS (1939) descreveram lesões desse tipo em raminhos e galhos de árvores novas de carvalho (*Quercus laurifolia* MICHX.) da Florida. VERGANI (1942) encontrou manchas das fôlhas e dos galhos de "ligustrina" (*Ligustrum sinense* LOUR.) na Argentina e conseguiu trans-

mití-las a fôlhas sãs por meio do ácaro *Tenuipalpus pseudocuncatus*, agente ou vetor da leprose dos Citrus na Argentina. KNORR e DUCHARME (1951) observaram infecção severa e queda acentuada das fôlhas na ligustrina e infecção moderada em "ligustrum" (*L. lucidum* AIT.). Observei a mesma doença em Ligustros (*Ligustrum* sp.) no Rio Grande do Sul (IB 2575). As manchas são pequenas, numerosas, frequentemente redondas, com um ponto escuro no centro.

BITANCOURT, DRUMMOND GONÇALVES e CARNEIRO (1935) assinalam a leprose em fôlhas de cambucá (*Myrciaria plicati-costata* BERG.) em São Paulo. As manchas são pequenas, arredondadas, escuras no centro, claras na periferia e apresentam disposição vagamente concêntrica (IB 844).

Em fôlhas de fruta de condessa (*Anona muricata* L.) de São Paulo, observei manchas do tipo da leprose, de tamanho médio, alongadas no sentido das nervuras secundárias, amarelas, com linhas escuras interrompidas, concentricas, na periferia (IB 4176, Est. 23, D).

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As lesões de leprose nos galhos, nas frutas e principalmente nas fôlhas, são extremamente variáveis. Nas fôlhas, por exemplo, as lesões podem ir desde a ausência quase total, conforme se verifica na Florida, até as manchas extensas, cobrindo uma fração considerável do limbo, que se observam na Argentina. Nos galhos vimos que as lesões podem faltar quase completamente como frequentemente acontece em São Paulo ou ao contrário atacar violentamente galhos e ramos, e, na opinião de alguns autores, até o tronco. Produzindo uma descamação generalizada a leprose pode acarretar a morte desses orgãos e até do vegetal todo, provavelmente em consequência da invasão das lesões por parasitas secundários. Nas frutas pode haver lesões de pequeno diâmetro, como em São Paulo ou grandes círculos, completos ou reduzidos a arcos, mas que podem ser numerosos a ponto de causar uma deformação das frutas, como na Argentina.

Alguns tipos de lesões assemelham-se muito às que são produzidas por algumas doenças de virus como o *ring-blotch*, a clorose zonada e a psorose B. Salientei, por exemplo, a semelhança das manchas de leprose das fôlhas observadas num especimen de São Roque, Argentina (Est. 20, A) com o *ring-blotch* da Africa do Sul (BITANCOURT 1935, fig. F). As manchas pálidas, grandes, irregulares, observadas às vezes em São Paulo, (Est. 17, C) parecem com algumas modalidades da clorose zonada (BITANCOURT e GRILLO 1934, est. 24, N.º 21 e 22), ao passo que as manchas grandes, contendo manchinhas

escuras, distribuidas em linhas paralelas, concentricas, que se observam na leprose do tipo "ciclose", assim como no tipo mais comum de leprose na Argentina (Est. 20, C) apresentam muita semelhança com algumas manchas de clorose zonada, em pomelo por exemplo (BITANCOURT e GRILLO 1934, Est. 21, n.º 6).

As manchas das frutas deprimidas, escuras, formando circulos ou arcos de circulos na clorose zonada (BITANCOURT e GRILLO 1934, est. 23, n.º 10 e 19) são quase identicas, embora maiores, que as manchas das frutas mais comuns da leprose na Argentina (Est. 21, D). Este mesmo tipo de mancha é encontrado na psorosis B (FAWCETT e BITANCOURT 1943, fig. 8). E' talvez esta última doença que maiores analogias apresenta com a leprose, tal como se apresenta na Argentina. As lesões dos galhos, das fôlhas (FAWCETT e BITANCOURT 1943, fig. 7) e, como vimos, das frutas, têm caracteres muito parecidos. E' este fato que me leva a crer que as lesões grandes da casca do tronco citadas por diversos autores (SPEGAZZINI 1920, KNORR e DUCHARME 1951a) sejam na realidade devidas à psorose B.

Havendo portanto formas de transição quase continua nos sintomas de leprose e algumas doenças de virus dos Citrus, acho mais plausivel a hipotese de que a leprose seja também uma doença de virus, do que o efeito da picada de um organismo toxicogênico, conforme afirma VERGANI (1945). *Tenuipalpus pseudocuneatus* seria então o vetor da doença e não seu causador direto.

As diferenças observadas nos sintomas da leprose nas diferentes regiões citricolas das Americas devem, em parte, ser devidas à ocorrencia de estirpes diferentes do agente da doença. E' esta, pelo menos, a conclusão a que se chega quando se observa que em dois hospedeiros diferentes, numa mesma localidade, as lesões apresentam caracteres em comum, proprios dessa localidade. Assim é que o tipo muito especial de mancha da fôlha que se observa no Paraguay se verifica tanto na laranjeira doce como na tangerineira. Exatamente o mesmo se dá com as manchas grandes, com manchinhas escuras, que são o tipo mais comum na Argentina, tanto na laranja doce como na tangerineira. Sem dúvida, porém, deve haver em certas regiões mais do que uma estirpe do agente da doença. Em Lavras, Minas Gerais, onde foi observado pela primeira vez o tipo de mancha das fôlhas que chamamos "ciclose" e que apresenta muita semelhança com o tipo mais comum encontrado na Argentina, observam-se igualmente as manchas menores que caracterizam a doença em São Paulo. Já mencionei, também, que na provincia de Corrientes além do tipo comum de manchas das fôlhas que acaba de ser citado, existe outro, de manchas menores, parecidas com as do *ring-blotch*.

Mas, além das diferenças de sintomas que são provavelmente devidas a estirpes diferentes do agente da doença, há as que dependem do hospedeiro. Sòmente experiências de transmissão, como as que são relatadas no próximo trabalho desta série (BITANCOURT 1955b) permitem apurar este fato com segurança. Vimos por exemplo que as lesões produzidas em tais experiências nas variedades Pera, Bahia e Lisa Paulista eram diferentes umas das outras, apresentando caracteres proprios. E' também sòmente em tais experiências que se podem apurar diferenças de sintomas devidas ao estado de maturação dos tecidos atacados. Delas trataremos no trabalho seguinte, acima mencionado.

STUDIES ON THE "LEPROSIS" DISEASE OF CITRUS
I — GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION AND SYMPTOMS

Abstract

Leprosis or Florida scaly bark of Citrus was first reported in literature in 1901 from Florida. It is now known to occur also in Mississipi, United States and in China, the Philippines, Ceylon, Java, Japan, Egypt, South Africa, Mexico, Brazil, Argentina, Paraguay and Bolivia.

Leprosis is chiefly a disease of the sweet orange but it is also occasionally found on other citrus hosts such as sweet lime (limeira da Persia), West Indian lime (limoeiro galego), sour orange, lemon, citron, grape-fruit, tangerine (laranjeira cravo) and mandarin (tangerineira). Leaf or twig spots resembling leprosis have been reported on laurel oak, privet, cambucá (Myrciaria plicati-costata) and soursop (Annona muricata).

Symptoms of leprosis vary according to the species or variety of the host, locality, region or country, phase of development of the diseased organ at the time of infection and most probably also according to strains of the causal agent.

Leprosis affects twigs, branches, leaves and fruits. By inducing severe spotting, scaling and splitting of the bark of twigs and branches it favors the introduction of secondary parasites which may kill those organs and, in severe cases, the whole tree. Leprosis spots greatly disfigure fruits and lower their commercial value.

On the leaves, symptoms vary from complete absence as is often the case in Florida, to small, roundish, dark green or light brown spots with yellow halo, to large, yellow spots with concentric markings, often in the form of minute, dark brown, raised spots, as usually found in Argentina. Symptoms on twigs and branches are

often absent in São Paulo, Brazil, or may deeply affect those organs, as large, scaling cankers, forming concentric rings around a flat center as is Argentina and Florida. On the fruits the lesions are depressed, dark brown or black, in the shape of round spots, circles or arcs of a circle.

Symptoms of leprosis may show great resemblance with some types of lesions of virus diseases of Citrus such as ring blotch, zonate chlorosis and psorosis B.

BIBLIOGRAFIA

ANONIMO — 1923 — Thirty-sixth annual report of the Mississippi agricultural experiment station for the fiscal year ending June 30, 1923. 63 pp.

ANONIMO — 1925 — State Plant Board revises ruling on Citrus scaly-bark. *Quart. Bull. State Plant Board Florida* **9**: 134-135.

ANONIMO — 1952 — List of intercepted plant pests, 1951 — S. R. A., B. E. P. Q., U. S. Dept. Agric. 61 pp.

ARENTSEN S. S., — 1945 — Enfermedades de los Citrus en Chile. *Simiente* **14**: 6-8.

BITANCOURT, A. A. — 1934a — Relação das doenças e fungos parasitas observados na secção de Fitopatologia durante os anos 1931 e 1932. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo **5**: 185-196.

BITANCOURT, A. A. — 1934b — As manchas das Laranjas. Descrição das principais manchas, podridões e outras alterações das laranjas, e dos meios para combatê-las. *Inst. Biol. S. Paulo Folh.* 53. 135. pp.

BITANCOURT, A. A. — 1935 — As doenças de virus dos Citrus. *Biológico* **1**: 255-262.

BITANCOURT, A. A. — 1937 — A leprose e a proxima colheita de laranjas. *Biológico* **3**: 37-40.

BITANCOURT, A. A. — 1938 — Será a laranjeira Sabará resistente ou imune à leprose? *Biológico* **4**: 300.

BITANCOURT, A. A. — 1940a — A leprose dos Citrus. *Biológico* **6**: 39-45.

BITANCOURT, A. A. — 1940b — A mancha de ácaro ou falsa ferrugem das laranjas. *Biológico* **6**: 189-192.

BITANCOURT, A. A. — 1941 — O tratamento da leprose dos Citrus. *Biológico* **7**: 149-152.

BITANCOURT, A. A. — 1943 — Distribuição teórica de lesões em fôlhas ou frutas, causadas por insetos e outros animais ou por agentes infecciosos transmitidos por vetores. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo **14**: 243-252.

BITANCOURT, A. A. — 1955a — Estudos sôbre a leprose dos Citrus II — Transmissão natural às fôlhas. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo **22**: 185-203.

BITANCOURT, A. A. — 1955b. — Estudos sôbre a leprose dos Citrus III — Transmissão natural às frutas. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo **22**: 205-218.

BITANCOURT, A. A. — 1955c. — Estudos sôbre a leprose dos Citrus IV — Experiências de tratamento. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo **22**: 219-231.

BITANCOURT, A. A., DRUMMOND GONÇALVES, R., & CARNEIRO, J. G. — 1935 — Relação das doenças e fungos parasitas observados na secção de Phytopathologia durante os anos 1933 e 1934. *Arch. Inst. Biol.* São Paulo **6**: 205-211.

BITANCOURT, A. A., FONSECA, J. P. & AUTUORI, M. — 1933 — Manual de Citricultura. IIa parte. Doenças, pragas e tratamentos. Chacaras e Quintais, São Paulo. 212 pp.

BITANCOURT, A. A. & GRILLO, H. V. S. — 1934 — A clorose zonada. Uma nova doença dos Citrus. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo **5**: 245-250.

BURGER, O. F. — 1923 — Report of Plant Pathologist. Ann. Rept. Florida Agric. Exp. Stat. for the fiscal year ending June 30, 1922. pp. 45R-55R.

BURGER, O. F. — 1924 — Report of Plant Pathologist. Rept. Florida Agri Exp. Stat. for the fiscal year ending June 30, 1924. pp. 84-R-113R.

BURGER, O. F. — 1925 — Report of the Plant Pathologist. Rept. Florida Agric. Exp. Stat. for the fiscal year ending June 30, 1925. pp. 42R-64R.

BURGER, O. F. — 1926 — Report of the Plant Pathologist. Rept. Florida Agric. Exper. Stat. for the fiscal year ending June 30, 1926. pp. 68R-84R.

BURGER, O. F. — 1927 — Report of Plant Pathologist. Rept. Florida Agric. Exp. Stat. for the fiscal year ending June 30, 1927. pp. 62-77R.

DOIDGE, E. M., & PLANK, J. E. van der, — 1930 — Concentric ring blotch of Citrus. reimpresso do *Farming in South Africa.* 6 pp.

DUCHARME, E. P., & KNORR, C. L. — 1950 — Relation between Argentina's lepra explosiva and Florida's scaly bark of citrus. (Abstract) *Phytopath.* **40**: 7.

FAWCETT, H. S. — 1911 — Scaly bark or nail-head rust of Citrus. *Florida Agr. Exp. Stat. Bul.* 106, 41 pp.

FAWCETT, H. S. — 1915 — Citrus Diseases of Florida and Cuba compared with those of California. *Univ. Calif. Agric. Exp. Stat.* Berkeley, Calif. *Bull.* **262**: 151-210.

FAWCETT, H. S. — 1936 — Citrus diseases and their control. McGraw-Hill Book Co. New York & London. 656 pp.

FAWCETT, H. S. — 1937 — Contacts with the Citrus industry and other observations in South America. *California Citrograph* **22**: 552-553, 571-572, 575.

FAWCETT, H. S., & BITANCOURT, A. A. — 1937 — Relatorio sôbre as doenças dos Citrus nos Estados de Pernambuco, Bahia, São Paulo e Rio Grande do Sul. *Rodriguesia* **3**: 213-236.

FAWCETT, H. S., & BITANCOURT, A. A. — 1940a — Observações sôbre as doenças dos Citrus no Paraguay. *Biológico* **6**: 289-296.

FAWCETT, H. S., & BITANCOURT, A. A. — 1940b — Observaciones sôbre las enfermedades de los citrus en el Uruguay. *Revist. Associación de Ingenieros Agronomos* (Montevideo) **12**: 3-8.

FAWCETT, H. S. & BITANCOURT, A. A. — 1943 — Comparative symptomatology of psorosis varieties on Citrus in California. *Phytopath.* **33**: 837-864.

FAWCETT, H. S., & BITANCOURT, A. A. — 1949 — Observaciones sobre las enfermedades de los Citrus en la Republica Argentina. *Rev. Sudamer. Bot.* **7**: 29-44. (multilith).

FAWCETT, H. S., & BURGER, O. F. — 1911 — A variety of *Cladosporium herbarum* on *Citrus aurantium* in Florida. *Phytopath.* **1**: 164-166.

FAWCETT, H. S., & LEE, H. A. — 1926 — Citrus diseases and their control. McGraw-Hill Book Co. New York & London. 582 pp.

FAWCETT, H. S., & MULLER, A. S. — 1936 — II. Estado de Minas Geraes, *in* Relatorio sobre as doenças dos Citrus no Distrito Federal, Estado do Rio de Janeiro e Minas Geraes. *Rodriguesia* **7**: 340-344.

FAWCETT, H. S., & RHOADS, A. S. — 1939 — Lesions on Quercus laurifolia similar to those of leprosis on Citrus in Florida. *Phytopath.* **29**: 907-908.

FREZZI, M. J. — 1940 — La lepra explosiva del naranjo. Investigaciones realizadas por el laboratorio de patologia de Bella Vista (Corrientes). *Bol. Frutas y Hortalizas.* Min. Agr. de la Nacion (Buenos Aires) **5**: 16 pp.

KNORR, L. C. — 1950 — Etiological association of a Brevipalpus mite with Florida scaly bark of citrus. (Abstract) *Phytopath.* **40**: 15.

KNORR, L. C., & DUCHARME, E. P. — 1951a — Anotaciones sobre lepra explosiva. *Idia* **42-43**: 32-38.

KNORR, L. C., & DUCHARME, E. P. — 1951b — The relationship between the Argentina's lepra explosiva and Florida's scaly bark, with implications for the Florida Citrus grower. *Plant Dis. Reptr.* **35**: 70-75.

MARCHIONATTO, J. B. — 1935 — Argentine Republic: New studies on the "lepra explosiva" of the orange. *Int. Bull. Pl. Prot.* **9**: 173-175.

MARCHIONATTO, J. B. — 1938 — Transmission de la "lepra explosiva" par les acariens. *Monit. Int. Prot. Plantes* **12**: 121M-122M.

MARCHIONATTO, J. B. — 1950 — Identificación de la lepra explosiva del Naranjo con la leprosis de los Citrus. *Cienc. y Invest.* **6**: 331-333.

OLIVEIRA, M. ALVES DE, — 1946 — Pragas e molestias das fruteiras nos sertões nordestinos. I. Citrus (Doenças). Min. Viação e Obras Publ. *Dep. Nac. Obras contra as secas. Publ. n.º 144*, série I, A, 64 pp.

RHOADS, A. S., & DEBUSK, E. F. — 1931 — Diseases of Citrus in Florida. *Univ. Florida, Agr. Exp. Stat. Bull.* 229. 213 pp.

ROLFS, P. H., FAWCETT, H. S., & FLOYD, B. F. — 1911 — Diseases of Citrus fruits. *Univ. Florida, Agr. Exp. Stat. Bull.* 108. 47 pp.

SPEGAZZINI, C. — 1920 — Sobre algunas enfermedades y hongos que afectan las plantas de "agrios" en el Paraguay. *Ann. Soc. Cient. Argentina* **90**: 155-188.

STEWART, I., & LEONARD, C. D. — 1952 — Molybdenum deficiency in Florida Citrus. *Nature* **170**: 174-175.

VERGANI, A. R. — 1942 — La transmisión de la "lepra explosiva" de la ligustrina por los ácaros. *Rev. Arg. Agron.* **9**: 292-294.

VERGANI, A. R. — 1945 — Transmision y naturaleza de la "lepra explosiva" del naranjo. (Publ.). *Min. Agr. Nacion. B. Aires Inst. Sanid. Veget. Serie A Año* v. n.º 3. 11 pp.

ZEMAN, V. — 1932 — Lepra explosiva del naranjo. *Univ. Nac. del Litoral, Facult. Agr. Ganad. y Industrias afines.* Corrientes. 29 pp.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 17

Fig. *A* e *B* — Fôlhas de laranjeira doce das variedades Peras (A) e Bahia (B) submetidas durante dois meses à infecção de leprose. S. Paulo, 8-1-41. T. N.

Fig. *C* — Fôlha de laranjeira doce com lesão grande de leprose. São Paulo, 12-5-35. T. N.

Fig. *D* — Mancha de leprose com linhas concêntricas em fôlha de laranjeira doce. Limeira, Jun. 1935. x 5.

Fig. *E* — Mancha de leprose com grande halo, em fôlha de laranjeira doce. São Paulo, Jul. 1932. x 10.

Estampa 18

Fig. *A* e *B* — Laranjas verdes (*A*) e no início da maturação (*B*) com manchas de leprose. São Paulo, Abril de 1932. T. N.

Fig. *C* — Laranja madura com manchas de leprose. S. Paulo, Abril de 1933. T. N.

Fig. *D* — Galhos de laranjeira com lesões de leprose. São Paulo, Jan. 1933. T. N.

Fig. *E* — Galhos (ladrões) de laranjeira com lesões de leprose. Limeira, 28-9-33. T. N.

Estampa 19

Fig. *A*, *B* e *C* — Fôlha, fruta e galho de laranjeira de um mesmo pé, com lesões de leprose. Algumas das manchas das fôlhas apresentam infecção secundária por fungos. Piracicaba, 20-7-39. T. N.

Estampa 20

Fig. *A* — Fôlha de laranjeira doce com manchas de leprose semelhantes ao *ring-blotch*. San Roque, Argentina, 14-4-35. T. N.

Fig. *B* — Fôlha de laranjeira doce com mancha atribuida à leprose. As areas escuras que cobrem todo o centro da mancha são também visiveis na face inferior dessa fôlha. Uruçuí, Out. 1945. T. N.

Fig. *C* e *D* — Fôlhas de laranjeira doce com manchas de leprose. As manchinhas escuras não são visiveis na face inferior das fôlhas. Monte Caseros (*C*) e Corrientes (*D*), Argentina, Abril de 1937. T. N.

Fig. *E* — Fôlha de laranjeira da variedade Bahia, com manchas de leprose. Asunción, Paraguay, 17-4-37. T. N.

Estampa 21

Fig. *A* e *B* — Laranjas verde (*A*) e madura (*B*) com lesões de leprose, da mesma árvore que a fôlha da est. 20, *D*. Corrientes, Argentina, 15-4-37. Um pouco reduzido.

Fig. *C* — Cidra com lesões atribuidas à leprose. Santo André, S. P., 18-6-36. T. N.

Fig. *D* — Laranja doce madura com lesões de leprose, do mesmo pé que as laranjas A e B. Um pouco reduzido.

Fig. *E* — Laranja doce madura deformada por lesões de leprose. Do mesmo pomar que as laranjas A e B. Um pouco reduzido.

Estampa 22

Fig. *A* a *F* — Manchas de leprose em fôlhas de diversas espécies cítricas: A, limeira da Persia; B, limoeiro siciliano; C, laranjeira cravo; D, cidreira; tôdas de um pomar da Capital, São Paulo, 15 e 20 de Março de 1933. E, laranjeira azêda; F, pomelo (grape-fruit) ambas de Merritt's Island, Florida, 17-12-26. Fot. A. S. Rhoads.

Fig. *G* — Fôlha de *Citrus* sp. com mancha de leprose do tipo "ombrose". As manchinhas pretas não são visíveis na face inferior da fôlha. Sorocaba, 5-1-37. Um pouco reduzido.

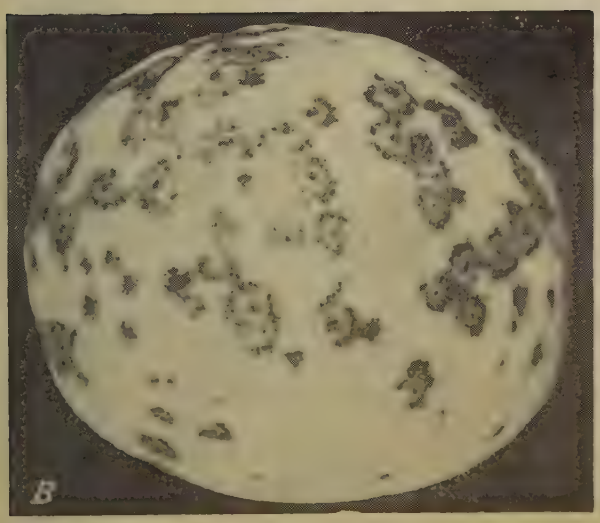
Estampa 23

Fig. *A* — Limão siciliano com manchas de leprose. Campinas, Jun. 1937. T. N.
Fig. *B* — Laranja doce com manchas de leprose, Asunción, Paraguay. 17-4-37.
Fig. *C* — Duas laranjas Pêra vistas nas duas faces mostrando a localização das manchas de leprose de um só lado da fruta. Campinas, 25-4-46.
Fig. *D* — Fôlha de fruta de condessa com manchas do tipo da leprose. Campinas, 29-4-41.
Fig. *E* — Tangerina com manchas de leprose, Asunción, Paraguay, 20-4-32. Um pouco reduzido.

A
B
C
D
E

A
D
B
C
E

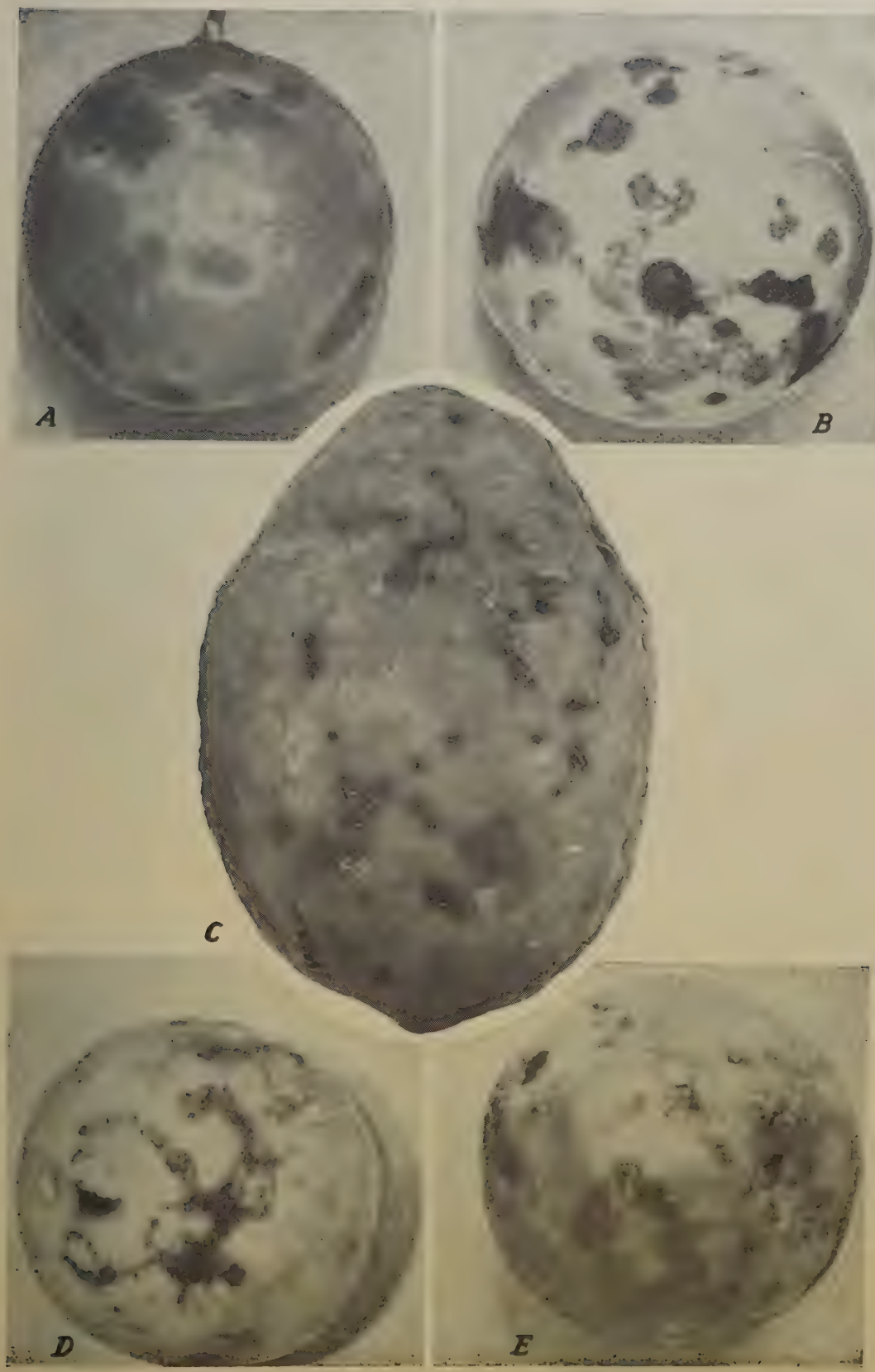
A



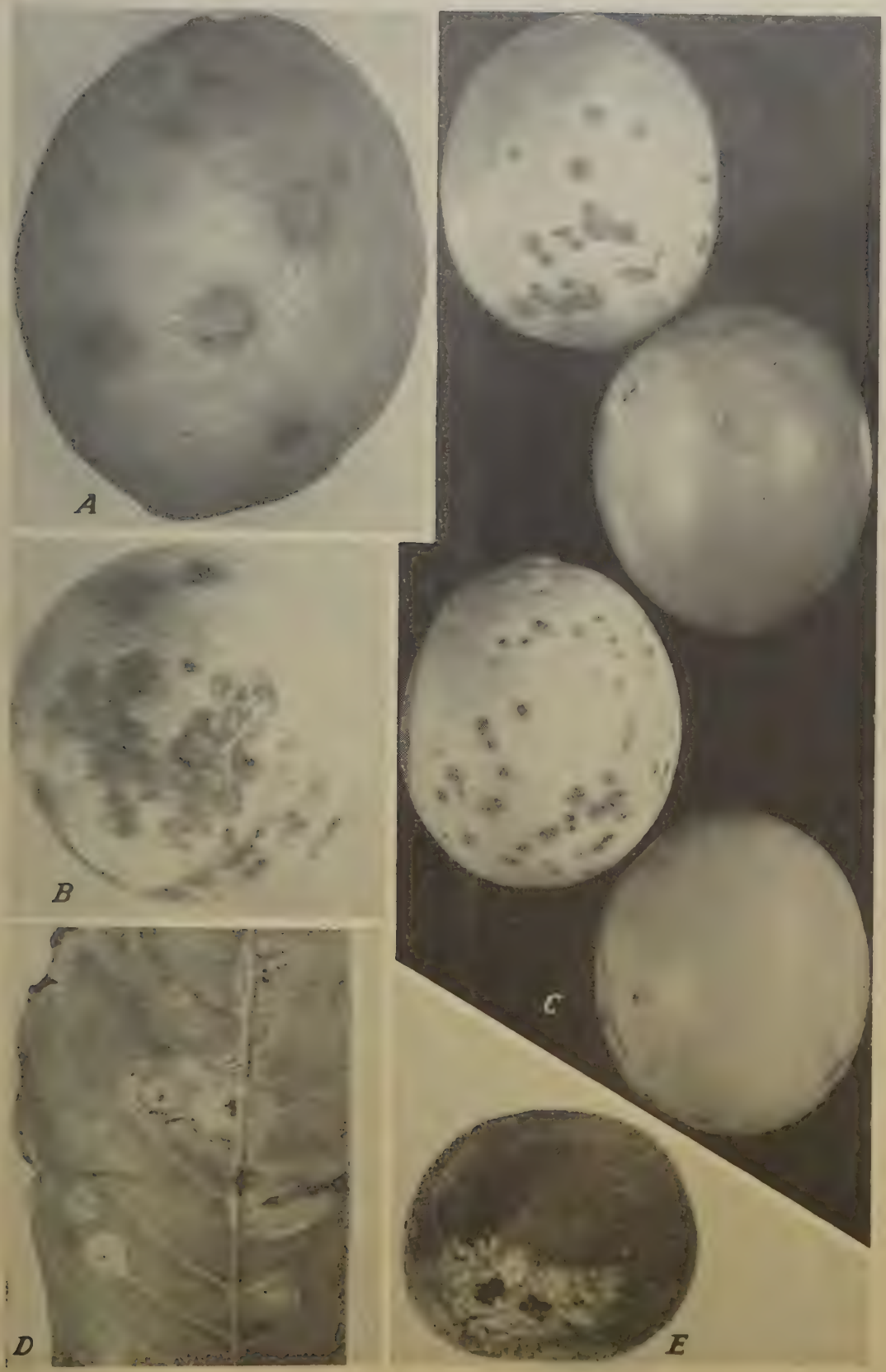
B

C

A
B
C
D
E


A
B
C
D
E

A
B
C
D
E
F
G


A
B
C
D
E

Vol. 22 — Artigo 15 Dezembro de 1955

ESTUDOS SÔBRE A LEPROSE DOS CITRUS
II — TRANSMISSÃO NATURAL ÀS FOLHAS

POR

A. A. Bitancourt

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Entre os métodos de controle das doenças de plantas cultivadas como a leprose dos Citrus, destacam-se entre os mais eficientes a escolha de variedades resistentes do hospedeiro e o combate por meio de substâncias químicas ao agente ou vetor da doença. No combate por aplicação de substâncias químicas, — na forma de pulverizações ou polvilhamentos, por exemplo, — é importante não sòmente a escolha das substâncias mais eficientes e das concentrações mais adequadas, como também das épocas mais propicias para estas aplicações. Uma das melhores maneiras de determinar essa época é de descobrir o momento do ano em que se dá a infecção. E' geralmente nesse momento ou pouco antes que se devem efetuar as aplicações preventivas com a substância escolhida.

As experiências que fazem o objeto do presente trabalho tiveram por fim determinar o grau de resistência à leprose de diversas variedades de laranjeira doce e o período do ano em que se realizava a infecção das folhas, assim como o estado de desenvolvimento desses orgãos, mais favoravel à infecção. Nos trabalhos seguintes da presente série serão relatadas experiências sôbre a infecção das frutas em diferentes estados de desenvolvimento (BITANCOURT 1955 b) e sôbre o combate químico à doença (BITANCOURT 1955 c).

O princípio das experiências sôbre a transmissão natural às fôlhas foi sugerido ao autor, em 1937, pelo falecido Professor HOWARD S. FAWCETT, durante a sua permanencia na America do Sul, onde, a convite do Instituto Biológico, realizou estudos e observações sôbre as doenças dos Citrus nas principais regiões citricolas do continente (FAWCETT 1937).

Na execução destas experiências contei com o valioso auxilio de várias pessoas e desejo mais especialmente expressar a minha gratidão aos Srs. Drs. J. G. CARNEIRO, K. SILBERSCHMIDT, e J. C. CARVALHO que em diferentes épocas dirigiram o campo experimental da Secção de Fitopatologia do Instituto Biológico, na Cantareira, Estado de São Paulo, Dr. O. FALANGHE, diretor da Fazenda Experimental Mato Dentro, em Campinas, Estado de São Paulo, Dr. S. C. ARRUDA e Srs. W. A. RODRIGUES, E. RACT, D. N. FRANÇA e J. DOS SANTOS.

METODO E MATERIAL

Quando foram iniciadas estas experiências, em 1938, não se conhecia o modo de transmissão da leprose. De fato, os estudos de FREZZI, — que reproduziu os sintomas da leprose infestando arvores novas de laranjeira doce com ácaros da espécie *Tenuipalpus pseudocuneatus* BLANCHARD retirados de lesões de leprose em árvores doentes, — sòmente foram publicados em 1940. Houve portanto que recorrer à transmissão natural para a determinação do grau de resistencia de diversas variedades de laranjeira doce e das épocas em que a transmissão se efetuava.

As experiências consistiram em colocar, durante um tempo variavel, pequenos pés de laranjeira debaixo de árvores que apresentavam sintomas de leprose nas fôlhas em abundância, de forma a que as folhagens das árvores doentes e das árvores sãs estivessem intimamente em contato. Os pés sãos foram adquiridos de um viveirista reputado e tinham aproximadamente dois anos de idade. Eram portanto plantas de pouco mais de um metro de altura, na idade em que se costuma transplanta-las do viveiro para o pomar. Tôdas, no inicio da experiência, estavam isentas de qualquer sintoma de leprose. Aliás, nunca observei esta doença em viveiros no Estado de São Paulo, ao passo que na Argentina ela é comum. As pequenas árvores foram plantadas em vasos de tamanho adequado, de forma a poderem ser manipuladas individualmente.

As árvores doentes eram em geral adultas, de 4 a 6 metros de altura. A que mais foi utilizada nestas experiências era um pé franco de laranjeira doce (*Citrus sinensis* OSB.) do campo experimental da Secção de Fitopatologia, representado na fig. A, estampa 24, do trabalho seguinte da presente série (BITANCOURT 1955 b). Esta árvore nunca tinha recebido tratamentos inseticidas ou fungicidas e sempre apresentou grande quantidade de fôlhas manchadas. Suas frutas, fortemente manchadas, amadureciam prematuramente, caindo em abundância em torno do pé. Na base e em torno dessa árvore e das demais utilizadas como fonte de infestação nas experiências, foram construidos jiraus cuja altura era tal que as plantas em vasos, colocadas sobre os mesmos, tinham a sua folhagem em contacto com a parte inferior da copa da árvore doente, conforme se pode ver na citada figura.

As plantas permaneciam nos jiraus durante um tempo variável, de 15 dias a 12 meses, findo o qual eram transportadas para um local afastado de pés de Citrus atacados de leprose. Na última experiência desta série as plantas, logo depois de retiradas do jirau,

foram pulverizadas com calda sulfo-cálcica, de modo a eliminar o ácaro, — já então conhecido, — autor ou vetor da doença. Evitou-se assim que aumentassse o número de infecções, depois de terminado o período de exposição à infestação debaixo da árvore doente. Esta precaução, entretanto, não foi tomada para as três primeiras experiências.

As leituras foram feitas em diversas épocas, em alguns casos vários meses depois de terminado o período de exposição à infestação, para dar tempo a que as manchas das fôlhas aparecessem. As leituras consistiram na anotação do número de manchas de cada fôlha manchada e do tamanho médio das manchas: pequenas, médias ou grandes. Sòmente o número total de manchas por árvore foi, entretanto, utilizado na apreciação dos resultados.

Houve um total de 4 séries de experiências, nos anos 1938-1939, 1940-1941, 1941 e 1946. Elas serão descritas nessa ordem a seguir.

EXPERIENCIA DE 1938-1939

O principal fim desta experiência tendo sido de apurar diferenças possíveis de suscetibilidade à doença de diferentes variedades de laranjeira doce, foram adquiridos pés das principais variedades comerciais então disponiveis nos viveiros da firma mais reputada do Estado. Era intenção utilizar 50 pés de cada variedade, mas, de algumas das menos procuradas pelos citricultores, não foi possivel conseguir senão um número bem menor, o que exigiu que para essas fosse restringido o plano experimental. Por este motivo o plano variou ligeiramente de uma para outra variedade. Utilizou-se um total de 500 plantas, das quais 107, das diversas variedades, foram reservadas para testemunhas e não foram expostas à infestação, por baixo da árvore doente. Do restante, 18 pés não puderam ser identificados no momento da leitura dos resultados, de forma que de sòmente 375 são dados os resultados abaixo. Destes, 18 pés eram de tangerineira da variedade Florida (*Citrus reticulata* BLANCO) e o restante de laranjeiras doces (*Citrus sinensis* OSB.) das seguintes variedades: Lisa Paulista, 16; Sanguinea, 20; Campista, 22; Pele de Moça, 27; Sabará, 42; Seleta vermelha, 49; Seleta branca, 48; Barão, 60, e Hamlin, 73. Foi maior o número de pés de Barão e Hamlin por terem sido as únicas variedades, então muito procuradas pelos citricultores, que conseguimos em grande quantidade.

Como árvore doente, fóco de infestação, foi utilizada a laranjeira doce a que acima me referí, do campo experimental da Secção de Fitopatologia. Sôbre o jirau construido em torno dessa árvore

foram colocadas, durante períodos de 1, 2, 3, 4 e 12 meses, diversos pés de cada variedade, os quais foram substituidos por outros quando findo o período respectivo de exposição à infestação. A primeira série foi colocada no dia 11 de Janeiro de 1938 e no dia 11 de cada mês seguinte (exceto no mês de Outubro que foi no dia 13 e no de Dezembro, no dia 12) foram feitas as substituições sucessivas dos pés de laranjeira. A experiência terminou no dia 11 de Janeiro de 1939, quando foram retirados os últimos pés que ainda se achavam no jirau.

A leitura dos resultados foi feita em diversas épocas, alguns meses depois de retiradas as plantas do jirau, a primeira em 21 de Maio de 1938 e a última em 5 de Julho de 1939. Nenhuma das 107 testemunhas apresentou manchas de leprose nas fôlhas. O resultado da leitura das 375 plantas expostas à infestação debaixo da árvore doente consta da tabela 1. Cada árvore da experiência está representada por um número ou nota, de 0 a 3, correspondcnte ao número de manchas que apresentava: 0, nenhuma mancha; 1, de 1 a 19 manchas; 2, de 20 a 50 manchas; 3, mais de 50 manchas. As árvores não identificadas no momento da leitura estão representadas por um traço.

O primeiro resultado que convem extrair dessa tabela, porque influe sôbre os demais, é o efeito do tempo de exposição à infestação. A média das notas de todos os pés expostos durante cada período, com exceção da variedade Sabará e da tangerineira, é o seguinte:

um mês	0,36
dois meses	0,91
tres meses	1,11
quatro meses	1,18
doze mèses	1,32

Vê-se que quanto maior o tempo de exposição à infestação, maior o número de manchas das fôlhas.

O tempo médio de exposição à infestação foi, em meses, para as diversas variedades, o seguinte: Lisa Paulista, 6; Sanguinea 4,15; Campista, 3,67; Pele de Moça, 2,67; Seleta vermelha, 2,33; Seleta branca, 2,40; Barão, 2,40, e Hamlin, 2,16. Para se classificarem as variedades de acôrdo com a suscetibilidade não se pode, portanto, utilizar as notas medias respectivas. A variedade Lisa Paulista, por exemplo, esteve exposta à infestação por um tempo medio de quase tres vezes o tempo durante o qual esteve exposta a variedade Hamlin. Uma comparação será entretanto possível se calcularmos

TABELA 1

Número de manchas de leprose nas fôlhas de pés de laranjeira doce de diversas variedades e de tangerineira Florida, colocados por períodos diversos por baixo da copa de uma laranjeira doce de pé franco fortemente atacada de leprose: 0, sem manchas; 1, com 1 a 19 manchas; 2, com 20 a 50 manchas; 3, com mais de 50 manchas.

Variedade	Nº de pés	Meses em que as mudas permaneceram debaixo do pé doente											
		Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Maio	Jun.	Jul.	Ag.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
Lisa Paulista	6	0		0		0		0		0		1	
	4	2			1			1			2		
	6	1,1,1,2,3,3											
Sanguínea	11	0	1	-	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	4	1			2			0			1		
	5	1,1,1,1,2											
Campista	12	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
	3	-			0			0			1		
	3	2				0				3			
	4	1,1,1,1											
Pele de Moça	12	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	6	0		1		3		1		1		1	
	4	3			3			1			2		
	3	1				2				1			
	2	1,1											
Sabará	21	0 -	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	- -	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	11	0 -		0, 0		0, 0		0, 0		0, 0		0, 0	
	8	0,0			0,1			0,0			0,0		
	2	0,1											
Seleta vermelha	23	1 -	0,0	1,1	0,0	1,3	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	1,1	0,0
	11	1 -		1, 1		1, 3		0, 2		1, 1		1, 2	
	7	1 -			0,1			0,1			1,1		
	6	0, 1				1, 1				0, 1			
	2	1,1											
Seleta branca	21	0 -	- -	0,1	0,0	1,2	0,1	0,0	0,0	0,1	1,1	0,1	0,1
	11	1 -		0, 0		1, 2		0, 3		1, 1		1,1	
	8	1,1			1,2			0,2			2,2		
	6	0, 3				0, 3				0, 1			
	2	1, 2											
Barão	23	0 -	0 0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
	16	1 - -		0, 1,2		1,1,1		0,1,3		1,1,1		1,1,1	
	11	1,1, -			1,1,2			0,1,2			1,1,1		
	8	2, 3, -				0,1,2				0,1,1			
	2	1,2											
Hamlin	35	0,0,-	0,1,1	0,1,1	0,0,0	0,0,1	1,1,1	0,0,1	0,0,0	0,0,0	0,0,1	0,1,1	0,0,0
	17	0,1,3		1,1,1		0,0,0		1,2,3		0,0,1		0,0,0	
	11	0,1,-			0,2,3			0,0,1			1,1,1		
	8	1, 2, -				0,2,3				0,1,1			
	2	1,1											
Tangerineira Florida	8	0	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0
	5	0		0		0		0		-		0	
	2	0				-				0			
	3	0,0,0											

para cada árvore um "indice de doença", que leve em consideração a nota e o número de meses durante o qual o pé foi submetido à infestação. Para este fim poderemos multiplicar a nota por um fator inversamente proporcional às notas medias acima citadas. Adotei os fatores 1, 1,125, 1,25, 1,50 e 3,8, que são aproximadamente inversamente proporcionais às notas medias correspondentes a 12, 4, 3, 2 e 1 mês, respectivamente. Por exemplo o indice de doença de uma árvore que permaneceu 2 meses no jirau (fator 1,5) e apresentou 25 manchas de leprose (nota 2), será 3. O de uma árvore que permaneceu 4 meses (fator 1,125) e apresentou mais de 50 manchas (nota 3) será 3,375.

Os indices de doença medios assim calculados para cada variedade são os seguintes:

Tangerineira Florida	0,00
Sabará	0,09
Sanguinea	1,12
Campista	1,19
Hamlin	1,20
Lisa Paulista	1,25
Barão	1,29
Pele de Moça	1,33
Seleta vermelha	1,62
Seleta branca	1,65

Nesta experiência, a tangerineira Florida mostrou-se completamente imune à leprose. Da variedade Sabará, sòmente 3 pés apresentaram manchas com 7, 10 e 10 manchas, respectivamente. Os indices médios das demais variedades apresentam diferenças pequenas, destacando-se sòmente as variedades Seleta branca e vermelha que apresentaram o máximo de manchas de leprose.

Não houve diferenças apreciaveis no tipo das manchas das diversas variedades de laranjeira doce, com exceção da variedade Lisa Paulista. Esta apresentou manchas de um tipo bastante raro, de grandes dimensões, com contorno irregular, uniformemente cloróticas em tôda a sua extensão, sem necrose no centro ou em aneis concentricos, como acontece com o tipo mais comum de manchas de leprose em São Paulo (BITANCOURT 1955 a) e que era o das demais variedades. O tipo de mancha da variedade Lisa Paulista, numa variedade não determinada de laranjeira doce, está ilustrado no primeiro trabalho desta série (BITANCOURT 1955 a, Est. 17, C).

Calculando em conjunto, para tôdas as variedades com exceção da tangerineira Florida e da variedade Sabará, a nota média das

árvores submetidas à infestação durante um periodo de um mês, encontramos:

Janeiro	0,33
Fevereiro	0,25
Março	0,41
Abril	0,00
Maio	0,64
Junho	0,64
Julho	0,25
Agosto	0,21
Setembro	0,21
Outubro	0,36
Novembro	0,36
Dezembro	0,07

Houve, nos cinco primeiros meses, uma oscilação do valor da nota média com máxima nos meses impares. Conquanto este fato talvez não tenha significação por serem pequenas as diferenças, veremos que ele se reproduziu na experiencia de 1940-1941.

Para os períodos maiores, as notas médias são:

Jan.-Fev.	0,50				
Mar.-Abr.	0,64	Jan.-Fev.-Mar.	1,00	J. F. M. A.	1,25
Maio-Jun.	1,00	Abr.-Mai.-Jun.	1,25	M. J. J. A.	1,07
Jul.-Ago.	1,14	Jul.-Ago.-Set.	0,56	S. O. N. D.	0,71
Set.-Out.	0,64	Out.-Nov.-Dez.	1,12		
Nov.-Dez.	0,07				

Por estes dados verifica-se que o máximo de infecção parece ter ocorrido em Maio e Junho para as árvores que foram infestadas durante um período de um mês, em Julho e Agosto, para as de dois meses, Abril a Junho no caso de tres meses e Janeiro a Abril no de 4 meses.

EXPERIENCIA DE 1940-1941

Na experiência anterior não tinham sido incluidas as duas principais variedades comerciais de São Paulo, a Pera e a Bahia. Elas foram objeto de uma experiência do mesmo gênero em 1940-1941. Nesta foi também incluida a variedade Sabará para comprovação da resistência que tinha manifestado na experiência anterior.

Como o tempo de um mês de exposição à infestação era visivelmente insuficiente, conforme se depreende da nota media baixa das árvores que permaneceram no jirau por esse lapso de tempo na experiência de 1938-1939, os pés foram colocados dois meses consecutivos no mesmo jirau, debaixo do pé franco de laranjeira doce fortemente atacado de leprose. De 11 a 13 pés de Pera, 12 a 13

de Bahia e 16 de Sabará, foram colocados cada mês, a partir de 2 de Fevereiro de 1940 e retirados dois meses mais tarde, sendo o último lote retirado no dia 2 de Março de 1941. As leituras foram feitas em 7, 8 e 9 de Janeiro e em 3 de Julho de 1941. Nenhuma das 192 laranjeiras da variedade Sabará apresentou manchas de leprose, o que confirmou os resultados anteriores, indicando a alta resistencia ou mesmo a imunidade completa desta variedade à leprose. Os resultados, para as variedades Pera e Bahia constam da tabela 2.

Tabela 2 — Distribuição, de acôrdo com o número de manchas de leprose nas fôlhas, e nota media de laranjeiras em vasos das variedades Pera e Bahia, colocadas durante dois meses, em diferentes meses do ano, debaixo de uma laranjeira doce de pé franco doente. Para o cálculo das notas medias foram atribuidas as notas 0, 1, 2 ou 3 aos pés com 0, 1 a 9, 10 a 30 ou mais de 30 manchas respectivamente.

MESES	PERA					BAHIA				
	manchas				nota média	manchas				nota média
	0	1-9	10-30	mais de 30		0	1-9	10-30	mais de 30	
Fev. - Mar.	5	6	0	1	0,75	2	9	1	0	0,92
Mar. - Abr.	2	3	5	1	1,46	5	7	0	0	0,58
Abr. - Mai.	7	4	1	0	0,50	2	8	2	0	1,00
Mai. - Jun.	0	9	3	0	1,25	10	2	0	0	0,17
Jun. - Jul.	12	1	0	0	0,08	7	6	0	0	0,46
Jul. - Ago.	11	1	0	0	0,08	11	2	0	0	0,15
Ago. - Set.	11	2	0	0	0,15	4	9	0	0	0,69
Set. - Out.	5	8	0	0	0,62	6	7	0	0	0,54
Out. - Nov.	10	3	0	0	0,25	12	1	0	0	0,08
Nov. - Dez.	9	4	0	0	0,31	8	5	0	0	0,39
Dez. - Jan.	4	6	1	0	0,73	6	6	0	0	0,50
Jan. - Fev.	3	6	2	1	1,08	1	2	7	2	1,84

Como na experiência anterior verifica-se uma oscilação do valor da nota média nos cinco primeiros meses, tanto para a variedade Pera como para a Bahia, mas a primeira apresenta máximos para as árvores colocadas no jirau nos meses impares e a segunda nos meses pares. Em conjunto, para as duas variedades, há uma diminuição marcada da nota média durante os meses de inverno, de Junho a Novembro. A nota média geral é 0,58 para a variedade Pera e 0,53 para a Bahia.

As manchas da variedade Pera eram menores e com necrose da parte central mais acentuada do que na variedade Bahia. Nestas se distinguiam aneis concentricos nas manchas maiores, como ocorre

muitas vezes nas manchas de leprose das fôlhas em São Paulo. Fôlhas manchadas de Pera e de Bahia desta experiência foram representadas na Estampa 17, A e B, do primeiro trabalho desta série (BITANCOURT 1955a).

EXPERIENCIA DE 1941

O estudo comparativo das manchas de leprose nas fôlhas, nas diferentes regiões citricolas das Americas (BITANCOURT 1955 a) mostrou que elas apresentam variações consideráveis. Além disto, na primeira experiência verificou-se a imunidade da tangerineira Florida, ao paso que nesta espécie cítrica encontram-se ocasionalmente sintomas de leprose nas fôlhas e nas frutas (BITANCOURT 1955 a). No proprio campo onde se realizaram a primeira e a segunda experiências, na Cantareira, havia um pé de tangerineira que apresentava numerosas lesões de leprose nas fôlhas. Estes fatos parecem indicar que pode haver diferentes estirpes do agente da doença, como acontece com inúmeras doenças das plantas. Para verificar esta hipotese foi feita em 1941 uma experiência, usando árvores das mesmas variedades da experiência anterior, Pera, Bahia e Sabará. A experiência baseou-se na possibilidade das estirpes do agente da leprose serem diferentes em diversas regiões do Estado e em hospedeiros diferentes. As árvores foram expostas à infestação pelo agente ou vetor da leprose debaixo dos seguintes pés de Citrus: a) a laranjeira doce de pé franco das experiências anteriores e a tangerineira doente, acima mencionada, ambas no campo experimental da Cantareira, b) 4 laranjeiras doces da variedade Bahia, do pomar experimental da Fazenda Mato Dentro, do Instituto Biológico, em Campinas, e c) um certo número de laranjeiras doces de um pomar comercial de Taubaté.

Os pés foram colocados debaixo das árvores doentes em 14 de Março na Cantareira, 9 de Abril em Campinas e no inicio de Abril em Taubaté. Eles foram retirados de debaixo das árvores doentes em 11 de Agosto na Cantareira, 9 de Setembro em Campinas e 26 de Agosto em Taubaté, ou seja aproximadamente 5 meses depois. A contagem do número de manchas de leprose nas fôlhas foi feita em seguida.

Nenhuma das 84 laranjeiras Sabará, das 4 colocadas debaixo da tangerineira, 40 debaixo da laranjeira doce na Cantareira, 20 debaixo das laranjeiras Bahia em Campinas e 20 debaixo das laranjeiras doces em Taubaté, apresentaram manchas de leprose, nova-

mente confirmando a imunidade desta variedade. Também estavam isentas de manchas as 40 laranjeiras Pera e Bahia em Taubaté, fato que atribuo à completa ausência de brotação dessas laranjeiras durante os quatro meses em que estiveram expostas à infestação. Esta falta de brotação durante os meses em que costuma ocorrer, — como aconteceu na Cantareira e em Campinas, — deve ser atribuida à falta de atenção e mais especialmente à falta de irrigação que sofreram as árvores em experiência em Taubaté.

Os resultados, para as laranjeiras Pera e Bahia colocadas debaixo de árvores doentes na Cantareira e em Campinas constam da tabela 3.

Tabela 3 — Distribuição, de acôrdo com o número de manchas de leprose nas fôlhas, e nota média de laranjeiras em vasos das variedades Pera e Bahia, colocadas durante cerca de 5 meses debaixo de árvores cítricas doentes. Para o cálculo da nota média foram atribuidas as notas 0, 1, 2 e 3 às árvores com 0, 1 a 9, 10 a 30 e mais de 30 manchas, respectivamente

Arvore doente	Local	PERA					BAHIA				
		manchas				nota média	manchas				nota média
		0	1-9	10-30	mais de 30		0	1-9	10-30	mais de 30	
Tangerineira	Cantareira ...	1	1	2	0	1,25	0	1	0	3	2,50
Laranjeira doce ...	Cantareira ...	1	1	4	3	2,00	0	5	2	2	1,64
Laranjeira Bahia .	Campinas	7	9	3	1	0,90	6	12	2	0	0,80

A variedade Bahia mostrou-se mais atacada debaixo da tangerineira e menos debaixo das laranjas doces do que a variedade Pera, como mostram as notas médias, mas a diferença não é provavelmente significativa. A nota media geral, 1,24, é aliás, a mesma para as duas variedades. As árvores doentes da Cantareira parecem ter sido melhores fontes de infestação do que as de Campinas, como se vê pelas notas medias. As últimas tinham, aliás, uma infecção de leprose muito mais baixa, a julgar pelo número de manchas das fôlhas que apresentavam.

As manchas das fôlhas nas duas localidades, não apresentaram qualquer diferença, sendo semelhantes às que tinham sido observadas na experiência anterior.

EXPERIENCIA DE 1946

Um certo número de fatos observados nas experiências anteriores indicavam que a infecção de leprose não se dá em folhas completamente desenvolvidas. Neste particular as fôlhas poderiam se

comportar como as frutas que apresentam o máximo de manchas quando expostas à infestação no período medio de seu desenvolvimento (BITANCOURT 1955 b). Estes fatos são em primeiro lugar a completa ausência de manchas nos pés de laranjeira em Taubaté, que não brotaram durante todo o período da experiência devido a não terem sido regados convenientemente. Em segundo lugar houve oscilação marcada da nota média nos meses sucessivos do principio do ano na primeira e na segunda experiência. Esta oscilação poderia resultar da ocorrência de brotações em meses alternados. Finalmente na segunda experiência o número de manchas de leprose foi muito maior durante os meses de Janeiro a Junho, durante os quais se dá a maior parte dos surtos de brotação, do que durante o resto do ano.

Para verificar a possibilidade da infecção de leprose sòmente se dar em fôlhas em fase de desenvolvimento, foi feita uma experiência com 80 pés francos de laranjeira doce em vasos, divididos em 4 grupos e que foram levemente podados em 12 de Fevereiro, 27 de Fevereiro, 13 de Março e 28 de Março. A poda parcial provocou a brotação dos pés e em 23 de Abril ou seja aproximadamente 10, 8, 6 e 4 semanas depois da poda de cada grupo, eles foram colocados debaixo das 4 laranjeiras Bahia doentes da Fazenda Mato Dentro, em Campinas, utilizadas na experiência anterior. As fôlhas novas achavam-se em diferentes estados de desenvolvimento nos 4 grupos, de acôrdo com a época da poda parcial.

Metade das árvores de cada grupo foi retirada dos jiraus em 9 de Maio e a outra metade em 23 do mesmo mês e foram portanto expostas à infestação durante 16 e 30 dias respectivamente. As árvores da primeira metade foram pulverizadas com calda sulfocálcica logo após terem sido retiradas dos jiraus, para destruir o vetor ou agente causal e as leituras foram feitas em tôdas as árvores, após a retirada dos pés do segundo grupo. O resultado da contagem das manchas de leprose consta da tabela 4.

Constata-se que as árvores expostas à infestação durante 4 semanas apresentam mais do dobro do número de manchas das que estiveram 2 semanas debaixo das árvores doentes.

Os pés de laranjeira podados aproximadamente 4 semanas antes de expostos à infestação, — e portanto com fôlhas novas menos desenvolvidas do que os pés dos outros grupos, — apresentam uma nota media inferior a estes últimos. As notas médias destes apresentam pouca diferença entre si.

Tabela 4 — Distribuição de acôrdo com o número de manchas de leprose nas fôlhas, e nota media de laranjeiras doces em vasos, levemente podadas em diversas épocas e colocadas em 23 de Abril de 1946 debaixo de 4 laranjeiras Bahia atacadas de leprose, pelo prazo de 16 e 30 dias. Para o cálculo da nota média foram atribuidas as notas 0, 1, 2 e 3, aos pés com 0, 1 a 9, 10 a 30 e mais de 30 manchas respectivamente

Data da poda	Fim da experiência	Número de manchas por pé				Nota média	
		0	1-9	10-30	mais de 30		
12 de Fevereiro ..	9 de Maio	6	3	0	1	0,6	1,15
	23 de Maio	2	2	3	3	1,7	
27 de Fevereiro ..	9 de Maio	4	5	1	0	0,7	1,30
	23 de Maio	1	1	6	2	1,9	
13 de Março	9 de Maio	5	2	3	0	0,7	1,25
	23 de Maio	1	3	4	2	1,7	
28 de Março	9 de Maio	4	6	0	0	0,6	0,90
	23 de Maio	2	4	4	0	1,2	

DISCUSSÃO

As experiências de FREZZI (1940) e VERGANI (1945) na Argentina, confirmadas por KNORR (1950) nos Estados Unidos, mostraram que o ácaro *Tenuipalpus* (*Brevipalpus*) *pseudocuneatus* BLANCHARD, retirado de lesões de leprose e colocado em laranjeiras doces sãs, produz nestas últimas as lesões típicas desta doença. Que o ácaro seja o proprio agente das lesões que produz, talvez pela ação tóxica de sua saliva, como quer VERGANI, ou que ele seja simplesmente o vetor de algum virus de efeito local, — como parece indicar a semelhança entre os sintomas de leprose e as lesões locais de outras doenças de virus, principalmente a psorose B (FAWCETT e BITANCOURT 1943), — não importa quanto ao que diz respeito à interpretação das presentes experiências. Nos dois casos, entretanto, deve se tratar de uma doença local e não sistémica como são a maioria das doenças de virus. A possibilidade de transmitir a leprose por simples aproximação da folhagem de uma laranjeira intensamente atacada, da folhagem de pequenas laranjeiras sãs, conforme ficou demonstrado nas experiências do presente trabalho, deve-se sem dúvida à passagem do ácaro da primeira para as últimas. Uma vez nas plantas sãs, o ácaro não sòmente começa a produzir as manchas de leprose como também deve se multiplicar, contribuindo, por sua vez, a sua descendência, para a formação de novas manchas. E' pena, portanto, que, devido à necessidade de esperar algum tempo para que as manchas das fôlhas aparecessem, as leituras não tives-

sem sido feitas imediatamente ao findar o período de exposição à infestação. Em alguns casos esperou-se quase 6 meses antes de fazer as leituras e é provavel que neste interim os ácaros tenham se multiplicado nas fôlhas. Os resultados das experiências, entretanto, indicam que o efeito dessa multiplicação dos ácaros, se de fato ela ocorreu, não foi suficiente para suprimir ou mascarar o da infestação inicial durante o período por baixo das árvores doentes. E' o que se deve concluir, por exemplo, do aumento do número de manchas de acordo com a duração desse periodo.

Na terceira experiência, feita em 1941, quando já se conheciam os resultados das experiências de FREZZI, as leituras foram feitas imediatamente depois de retiradas as laranjeiras dos jiraus e na última, em 1946, as laranjeiras foram pulverizadas com calda sulfo-cálcica, logo após terem sido retiradas dos jiraus, o que deve ter destruido o ácaro e impedido a sua multiplicação.

Nas 4 experiências descritas, foi tomado como criterio do grau de infecção o número de manchas de leprose apresentado por cada árvore submetida à experiência. Cada uma recebeu, de acôrdo com o número de manchas que apresentava, uma nota, numa escala convencional, o que permitiu calcular uma nota média para cada grupo de árvores e com esta comparar os grupos entre si. Para apurar as diferenças entre variedades foi necessário conferir a cada árvore um indice de doença que levasse em consideração não sòmente a nota, de acôrdo com o número de manchas de leprose, como também o tempo de exposição à infestação.

Teria sido muito desejável que, nas comparações efetuadas, tivesse sido levado em consideração o erro experimental que afeta as notas e os indices médios. Para isto teria sido necessário fazer-se a análise de variancia dos dados experimentais. Esta análise não foi possível por desconhecermos a que tipo de distribuição obedecem as manchas de leprose das fôlhas. Esta distribuição não parece ser nem a de Poisson, a binomial ou a distribuição contagiosa (BITANCOURT 1943) e não foi portanto possível aplicar aos dados experimentais uma das transformações usuais que permitem realizar a análise de variancia, com dados que não se distribuem normalmente.

Na falta de um erro experimental é portanto com muita cautela que se devem tirar conclusões dos resultados das experiências em apreço. Não pode haver dúvida, entretanto, que as experiências demonstraram a alta resistência e provavelmente a completa imunidade da tangerineira Florida e da laranjeira Sabará, pelo menos para a estirpe do agente da leprose das plantas que serviram de fóco de

infestação. Um total de 318 laranjeiras Sabará foram submetidas à infestação nas tres primeiras experiências, em condições idênticas a outras variedades que apresentaram no fim da experiência um número às vezes consideravel de manchas de leprose. Sòmente na primeira experiência 3 laranjeiras Sabará mostraram tais manchas, em número de 7, 10 e 10 respectivamente. O fato de, nas duas experiências seguintes, com número muito maior de pés dessa variedade, não ter sido observado um só caso de folhas manchadas, leva a crer que os três pés em questão não eram efetivamente dessa variedade. Deve se notar que a laranjeira Sabará, na opinião de alguns técnicos, não é uma laranjeira doce pura e sim possivelmente um híbrido de laranjeira doce e de tangerineira. Embora manchas de leprose tenham sido observadas em tangerineira (BITANCOURT 1955 a), o que era o caso de uma das árvores doentes utilizadas como fonte de infestação na terceira experiência, esta espécie cítrica em geral mostra-se resistente ou mesmo imune à leprose. Na primeira experiência, aliás, a tangerineira Florida mostrou-se completamente imune.

Entre as laranjeiras doces de diversas variedades da primeira experiência não parece haver diferenças significativas quanto ao número de manchas, salvo as duas variedades Seleta, a branca e a vermelha, que apresentam um indice de doença sensivelmente maior que as demais, o que talvez indique uma maior suscetibilidade dessas duas variedades.

Na segunda experiência a nota média para a laranjeira Pera foi 0,58 e para a Bahia 0,53. Na terceira experiência ela foi 1,24 para as duas variedades. A Pera e a Bahia apresentam portanto praticamente o mesmo grau de suscetibilidade à leprose.

A maior parte das variedades experimentadas mostraram manchas de leprose nas fôlhas do tipo usualmente encontrado em São Paulo, isto é, de tamanho médio e com necrose não muito acentuada dos tecidos do centro das manchas. A variedade Lisa Paulista, entretanto, constitui uma exceção pois tinha manchas cloróticas, grandes, irregulares, sem sinal de necrose. Manchas desse tipo foram ilustradas no trabalho anterior desta série (BITANCOURT 1955 a, est. 17, *C*). As manchas das variedades Pera e Bahia, embora do tipo comum em São Paulo, apresentaram na segunda experiência ligeiras diferenças entre si, as da Pera sendo um pouco menor, com necrose mais acentuada do centro, e as da Bahia apresentando linhas escuras concentricas. Estas manchas foram igualmente ilustradas no trabalho anterior (BITANCOURT 1955 a, est. 17, *A* e *B*).

E' certamente significativo o aumento do número de manchas de leprose de acôrdo com o aumento do tempo de exposição que se verificou na primeira experiência. Evidentemente, quanto maior o tempo de que dispõem os ácaros para passar da árvore doente para as sãs, maior a infestação destas últimas.

Pelos motivos expostos não se pode atribuir muita importância às variações da nota média que se observam de mês a mês na primeira experiência. Nota-se, entretanto, nos cinco primeiros meses do ano, uma periodicidade dessa média que é observada novamente na experiência seguinte. Essa periodicidade poderia resultar de uma suscetibilidade variavel da fôlha à infecção, de acôrdo com seu grau de desenvolvimento, combinada com a ocorrência de dois em dois meses de um surto de vegetação, nos primeiros meses do ano. Sòmente durante uma parte desses dois meses as fôlhas se encontrariam numa fase de desenvolvimento favorável à infecção de leprose.

As variações do número de manchas que se observam durante os diversos periodos do ano na segunda experiência (tabela 2) são provavelmente significativas. Nota-se, de Janeiro a Maio, um número muito maior de manchas do que de Junho a Dezembro. Esta variação pode ser devida ao fato da vegetação das laranjeiras ser mais ativa durante os meses de verão, com muitos surtos de brotação, ou então à ocorrência dos ácaros em maior número durante o periodo de verão e outono. Na quarta experiência constatou-se que o número de manchas é menor nas plantas que apresentam fôlhas em inicio de desenvolvimento em consequência de uma poda recente do que em fôlhas em fase de desenvolvimento mais adiantado.

Em resumo, as indicações fornecidas por estas experiências sôbre a possível diferença de suscetibilidade das fôlhas à leprose, de acôrdo com seu grau de desenvolvimento, são as seguintes: 1.º Maior número de manchas durante os meses de verão em que ocorre a maior parte dos surtos de vegetação nas laranjeiras; 2.º Alternancia da nota média durante os primeiros meses do ano; 3.º Menor número de manchas em árvores recentemente podadas e portanto com maior número de fôlhas em inicio de desenvolvimento; 4.º Ausencia de manchas em árvores que não brotaram durante o periodo de 5 meses em que estiveram expostas à infestação, em Taubaté. Nas experiências sôbre a transmissão natural às frutas (Bitancourt 1955 b) foi constatado que as frutas muito novas ou já maduras, são pouco manchadas, ocorrendo o máximo de manchas durante o periodo médio de desenvolvimento das frutas.

Nenhum argumento a favor da tese de que existe mais de uma estirpe do agente da leprose, — que esse agente seja o proprio

ácaro ou algum virus por êle transmitido, — foi fornecido pelas 4 experiências. A terceira que visava esclarecer este ponto não reverou quaisquer diferenças de sintomas nas árvores que contrairam a infecção em duas localidades diferentes, Cantareira e Campinas, e de fontes de infestação diferentes: laranjeiras doces, laranjeiras Bahia e tangerineira. A completa imunidade da tangerineira Florida revelada na primeira experiência, — ao passo que tangerineiras doentes têm sido observadas em São Paulo e outras regiões, uma delas servindo de fonte de infestação na terceira experiência, — deve ser considerada como um carater varietal, proprio da tangerineira Florida, e não como proveniente do fato de que a estirpe do agente da doença da laranjeira usada como fonte de infestação na primeira experiência era diferente, por não ser virulenta à tangerineira, da da tangerineira usada como fonte na terceira experiência.

STUDIES ON THE "LEPROSIS" DISEASE OF CITRUS
II — NATURAL TRANSMISSION TO THE LEAVES

Abstract

In four experiments between 1938 and 1946, young potted trees were placed under diseased adult trees, the leaves of which showed abundant spots of leprosis, so that the foliages were in intimate contact. In the first experiment trees of the sweet orange varieties: Lisa Paulista, Sanguinea, Campista, Pele de Moça, Sabará, Seleta vermelha, Seleta branca, Barão and Hamlin and of the Florida variety of mandarin orange were thus placed under a diseased sweet orange tree during 1, 2, 3, 4 or 12 months throughout a whole year beginning in January. Readings were made from one to five months after the trees had been removed from under the diseased tree and consisted in counting the leaf spots. A disease index was calculated for each tree, the trees being distributed in classes numbered 0, 1, 2 or 3 according to the number of leaf spots, viz: 0, 1 to 19, 20 to 50 and more than 50 spots, respectively. The class number was multiplied by a factor of 1, 1.125, 1.25, 1.5 and 3.8 according to the number of months: 12, 4, 3, 2 or 1 during which the trees had remained under the diseased tree. None of the 18 trees of the Florida mandarin showed any spots and 3 out of the 42 Sabará orange trees showed 7, 10 and 10 spots respectively. The mean disease index for this variety was 0,09. Since, in later experiments no Sabará orange tree showed any infections, it is believed that those 3 trees were not actually of this variety. The Sabará orange is thought to be a hybrid of sweet orange and tangerine.

The disease index of the two Seleta varieties, red and white, was 1.62 and 1.65 and that of the other varieties ranged from 1.12 to 1.33. It seems therefore that the Seleta varieties are somewhat more susceptible than the rest.

The mean class number of trees of all varieties that had remained 1, 2, 3, 4 and 12 months under the diseased tree were 0.36, 0.91, 1.11, 1.32 respectively, showing that the more the trees were exposed to infestation by the vector of the disease the more they were spotted.

Leaf spots exhibited by the different varieties were of the type commonly observed in São Paulo, except for the Lisa Paulista variety which showed large, irregular, chlorotic spots, with no necrosis of the tissues in the center of the spots.

In the second experiment 147 trees of the Pera variety of sweet orange, 150 of the Bahia (navel) variety and 192 of the Sabará orange were placed each month in groups of 11 to 16, under the same diseased tree as in the first experiment, for periods of two months throughout a year starting in February. At the end of the the experiment the leaf spots were counted and trees were distributed in classes numbered 0, 1, 2 or 3 according to the number of leaf spots: 0, 1 to 9, 10 to 30 and more than 30 spots, respectively. No leaf spots developped in the Sabará trees and the mean class number was 0.57 for the Pera trees and 0.53 for the Bahia trees. There were more leaf spots in the trees that had remained under the diseased tree between January and June than in those of the other months of the year. The leaf spots on the Pera variety were somewhat smaller and more necrotic in the center than those of the Bahia variety which showed concentric rings.

In the third experiment 84 trees of the Sabará orange and 53 trees each of the Pera and Bahia varieties of sweet orange were placed during 5 months from March to September, under several diseased trees, viz.: a mandarin tree and the sweet orange tree of the previous experiments, at Cantareira, four Bahia orange trees at Campinas and several sweet orange trees of a commercial orchard at Taubaté, all in the State of São Paulo. At the end of the experiment none of the Sabará trees showed any spots on the leaves, thus confirming the immunity of this variety already evident in the two previous experiments. None of the sweet orange trees of

the Pera and Bahia varieties in Taubaté showed any spots. Since the trees had not been watered at all and had practically produced no flush of growth, the lack of infection is attributed to the fact that there were no developping leaves on the trees.

The same class numbers as in the preceeding experiment were used. The Pera and Bahia varieties had the same mean class number: 1.24. The differences in the mean class number between the trees under the mandarin tree at Cantareira and under the sweet orange trees at Cantareira and Campinas are not considered significant.

In the fourth experiment 80 young potted seedling trees of sweet orange were divided in four equal groups which were lightly pruned on February 12 and 27, March 13 and 28, respectively, so as to induce sprouting. All trees were placed on April 23 under the four diseased Bahia trees of the third experiment, at Campinas. One half of the trees were removed from under the diseased trees on May 9 and were sprayed with lime-sulphur immediately, in order to kill the vector of the disease. The other half was removed on May 23. Trees were distributed according to the number of leaf spots in the same classes as in the previous experiment. The mean class number of the trees that remained one month under the diseased trees was more than double that of those which remained two weeks. The mean class number of trees that had sprouted during 4, 6, 8 and 10 weeks were respectively 0.90, 1.25, 1.30 and 1.15. This is interpreted as indicating that the younger leaves of the first group of trees were less susceptible to leprosis than those in a more advanced stage of development.

BIBLIOGRAFIA

BITANCOURT, A. A. — 1943 — Distribuição teórica de lesões em fôlhas e frutas, causadas por insetos e outros animais ou por agentes infecciosos transmitidos por vetores. *Arq. Inst. Biol.* São Paulo 14: 243-252.

BITANCOURT, A. A. — 1955a — Estudos sôbre a leprose dos Citrus I — Distribuição geográfica e sintomatologia. *Arq. Inst. Biol.* S. Paulo 22: 161-184.

BITANCOURT, A. A. — 1955b — Estudos sôbre a leprose dos Citrus III — Transmissão natural às frutas. *Arq. Inst. Biol.* S. Paulo 22: 205-218.

BITANCOURT, A. A. — 1955c — Estudos sobre a leprose dos Citrus IV — Experiências de tratamento. *Arq. Inst. Biol.* S. Paulo 22: 219-231.

FAWCETT, H. S. — 1937 — Contacts with the Citrus industry and other observations in South America. *California Citrograph* 22: 552-553, 571-572, 575.

FAWCETT, H. S. & BITANCOURT, A. A. — 1943 — Comparative symptomatology of psorosis varieties on Citrus in California. *Phytopath.* **33**: 837-864.

FREZZI, M. J. — 1940 — La lepra explosiva del naranjo. Investigaciones realizadas por el laboratorio de patologia de Bella Vista (Corrientes). *Bol. Frutas y Hortalizas. Min. Agr. de la Nacion* (Buenos Aires) **5**: 16 pp.

KNORR, L. C. — 1950 — Etiological association of a Brevipalpus mite with Florida scaly bark of citrus (Abstract) *Phytopath.* **40**: 15.

VERGANI, A. R. — 1945 — Transmision y naturaleza de la "lepra explosiva" del naranjo. *Publ. Min. Agr. Nación. Inst. Sanid. Veget. Serie A Año 1* n.º 3. 11 pp.

Vol. 22 — Artigo 16 Dezembro de 1955

ESTUDOS SÔBRE A LEPROSE DOS CITRUS

III — TRANSMISSÃO NATURAL ÀS FRUTAS

POR

A. A. Bitancourt

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com as estampas 24-26

A importância economica da leprose decorre dos prejuizos causados pelas lesões nos galhos, ramos e frutas. As manchas das fôlhas, mesmo quando numerosas, sòmente reduzem ligeiramente a área fisiologicamente ativa das fôlhas e não podem contribuir para baixar sensivelmente a produção das laranjeiras doentes. As lesões dos galhos e ramos, quando numerosas, podem causar a morte desses orgãos, provavelmente não diretamente e sim abrindo feridas que permitem a introdução de fungos parasitas (BITANCOURT 1955a). Arvores muito atacadas podem definhar e mesmo morrer em consequência da seca da maioria de seus ramos. As lesões das frutas sòmente interessam a casca e não têm qualquer efeito sôbre as qualidades da polpa. Quando numerosas e grandes, entretanto, podem chegar a deformar a fruta e a provocar a sua maturação e queda antecipadas. Mesmo em pequena quantidade, essas lesões são muito visiveis e contribuem para depreciar consideravelmente o valor comercial das laranjas. Para a exportação, notadamente, as laranjas devem ser inteiramente isentas de manchas de leprose.

Em São Paulo as lesões dos galhos e ramos são em geral raras e pouco importantes de forma que sòmente as lesões das frutas têm real importancia economica. Quando ocorrem, principalmente em pomares comerciais cujas frutas se destinam à exportação, é indispensável tratar as árvores doentes com parasiticidas de maneira a prevenir o aparecimento de lesões nas frutas. Estes tratamentos preventivos são faceis e eficientes (BITANCOURT 1955c) de modo que a leprose pode ser considerada uma doença de facil combate. Na Florida a doença desapareceu quase por completo, sem dúvida em consequência do tratamento preventivo dos pomares, não contra a leprose propriamente dita, e sim contra as pragas que prevalecem naquele estado norte-americano.

O tratamento preventivo contra a leprose nas frutas deve, logicamente, ser aplicado um pouco antes da ocorrência da infecção e o fim principal das experiências que serão relatadas no presente trabalho foi de determinar o momento em que a infecção se realizava, durante o desenvolvimento das frutas. O trabalho anterior desta

série (BITANCOURT 1955b) relatou as experiências do mesmo gênero realizadas em relação à infecção das fôlhas.

Como, quando estas experiências foram iniciadas, não se conhecia ainda o agente ou vetor da doença, o ácaro *Tenuipalpus pseudocuneatus* BLANCHARD (FREZZI 1940), foram incluidas entre elas, experiências destinadas a fornecer indicações sôbre o tamanho desse vetor, cuja existência se suspeitava antes das experiências de FREZZI.

Várias pessoas auxiliaram-me na execução dessas experiências e é com prazer que consigno aqui os meus agradecimentos aos Srs. E. RACT, J. DOS SANTOS e especialmente ao Sr. D. N. FRANÇA que executou integralmente, de acôrdo com os planos que tracei, as experiências de 1942.

MATERIAL E METODO

As experiências foram realizadas em 1939, 1940, 1941 e 1942 e abrangeram quatro safras de laranjas. Foi utilizada principalmente a laranjeira doce de pé franco (*Citrus sinensis* OSB.) do pomar da Seção de Fitopatologia, na Cantareira, usada como fonte de infestação na maior parte das experiências sôbre a transmissão natural às folhas, relatadas no trabalho anterior desta série (BITANCOURT 1955b). Esta laranjeira está representada na est. 24, fig. A. Nas experiências de 1940 foi também utilizada uma laranjeira doce da variedade Pera, do mesmo pomar.

Como se suspeitava que as lesões de leprose das frutas eram lesões locais e poderiam ser prevenidas, impedindo-se o acesso do agente ou vetor da doença até a superfície das frutas, as experiências consistiram em protege-las contra essa infestação, em diversas épocas de seu desenvolvimento, encerrando-as, sem arrancá-las da árvore, em frascos de vidro ou em caixas de tela de arame.

Os frascos de vidro tinham a forma de um funil, dilatado na parte mediana, para permitir o desenvolvimento normal da fruta, dentro do funil, até a maturação se fosse necessário (Est. 25, A). A parte inferior do funil recebeu um tampão de algodão em rama, e a parte superior foi fechada, em torno do pedúnculo da fruta, com o mesmo material. Um cartucho de papel impermeável foi amarrado, na forma de um cone, em torno do pedúnculo, de modo a cobrir tôda a parte superior do frasco, protegendo o algodão das chuvas e da poeira (Est. 24, B).

As caixas de tela de arame tinham forma cúbica, as 6 paredes sendo constituidas por tela de arame de ferro galvanizado, com malhas de diversos tamanhos. No interior da caixa, uma armação de tela de arame de malhas largas (tela de galinheiro) mantinha

a fruta no centro da caixa, impedindo que ela entrasse em contato com as paredes laterais. Isto tinha por fim evitar que as frutas fossem inoculadas, por exemplo por algum inseto sugador que introduzisse sua tromba por entre as malhas das paredes exteriores (Est. 25, C). As caixas foram feitas de tela de arame com 8, 14, 20, 28 e 40 malhas por polegada (Est. 24, C).

As juntas das paredes das caixas eram perfeitamente estanques, sem frestas ou aberturas, exceto as da parede superior, constituida de duas seções que deslizavam numa ranhura, de forma a se poder abrir a caixa e introduzir a fruta. Em seguida, as frestas eram tapadas com parafina derretida, aplicada com um pincel, e o espaço entre o pedúnculo e as duas seções da tampa era calafetado com algodão em rama.

Na primeira experiência verificou-se que as frutas muito manchadas de leprose amadureciam e caiam prematuramente. As frutas usadas como testemunhas, colhidas na árvore juntamente com as frutas encerradas em frascos, no fim da experiência, tinham um número de manchas muito inferior às frutas prematuramente caídas no chão e não eram, portanto, representativas da infecção ocorrida em frutas não protegidas. Nas experiências seguintes este inconveniente foi evitado, escolhendo-se ao acaso as frutas testemunhas no inicio da experiência e colocando-as em armações de arame onde elas permaneciam encerradas depois de desprendidas do pedúnculo (Est. 25, B).

As leituras, que consistiram na contagem das manchas de cada fruta, foram feitas no momento da maturação, ou seja no momento em que as frutas teriam normalmente sido colhidas para venda local. As frutas receberam uma nota: 0, 1, 2 ou 3, de acôrdo com o número de manchas que apresentavam, isto é, 0, 1 a 9, 10 a 30 e mais de 30 manchas, respectivamente.

A colocação das frutas em frascos ou em caixas de tela muitas vezes ocasionou feridas nos pedúnculos e nas frutas e um número bastante consideravel de frutas em cada experiência, foram perdidas por não se terem desenvolvido, terem apodrecido ou murchado antes do fim das experiências. Além disto alguns frascos se quebraram ou cairam no chão ou suas etiquetas se perderam. Sòmente foram incluidas na leitura dos resultados as frutas que se conservaram intactas até o fim da experiência. O ambiente dos frascos e das caixas, entretanto, mostrou-se favorável à proliferação, na superfície das frutas, de cochonilhas como *Lepidosaphes pinnaeformis* (Bouché) cuja infestação deve ter ocorrido nos períodos em que as frutas se achavam desprotegidas. E' também a infecções ante-

riores à colocação em frascos ou caixas que se deve, sem dúvida, as lesões de melanose e de verrugose, causadas, respectivamente, pelos fungos *Phomopsis citri* FAWC. e *Elsinoe australis* BITANC. & JENKINS. Algumas laranjas também mostraram-se afetadas de "mancha estrelada" (BITANCOURT 1934). Nenhuma dessas pragas ou doenças impediu a contagem das manchas de leprose, sendo por isto incluidas nas contagens as laranjas que as apresentavam.

EXPERIÊNCIAS COM FRUTAS PROTEGIDAS EM FRASCOS DE VIDRO

Experiência preliminar de 1939: Nesta experiência, que teve por fim verificar se os frascos de vidro protegiam efetivamente as frutas contra a infecção, 45 laranjas foram colocadas nos frascos em 26, 28 e 30 de Janeiro. As frutas permaneceram nos frascos até 5 de Junho, quando se verificou que, das 22 frutas intactas, 3 frutas sòmente apresentavam umas poucas manchas de natureza duvidosa. Uma segunda leitura em 8 de Julho, depois de colhidas as laranjas, confirmou esse resultado. Considerando as manchas como de leprose, a nota média das 22 laranjas protegidas em frasco era 0,14. Na mesma árvore, de 22 frutas não protegidas, colhidas ao acaso, 8 não apresentavam manchas e o restante apresentava de 1 a 21 manchas cada uma:

Número de manchas	0	1	2	2	3	4	6	9	15	19	21
Número de frutas	8	1	1	1	3	3	2	1	1	1	1

De acôrdo com a escala convencional acima citada, estas testemunhas tinham pois a nota media 0,77. Um número igual de frutas caídas no chão foi observado, tendo-se nelas encontrado um número consideravelmente maior de manchas.

Experiência de 1940: 102 laranjas da mesma laranjeira foram encerradas em frascos de vidro em 26, 27, 29 e 31 de Janeiro. 31 laranjas, escolhidas ao acaso na mesma árvore, foram colocadas nas armações de arame para testemunhas em que elas permaneceram presas, mesmo depois de desprendidas do pedúnculo.

As leituras foram feitas à medida que as frutas se tornavam maduras em 21 e 29 de Maio e em 25 de Junho. Perderam-se 17 frutas por diversas causas. A distribuição do restante das frutas, de acôrdo com o número de manchas que apresentavam, e a nota media de cada grupo de laranjas, constam da tabela 1.

Tabela 1 — Distribuição das laranjas colocadas em frascos nos dias 26 a 31 de Janeiro de 1940, de acôrdo com o número de manchas de leprose que apresentavam nas datas indicadas. Para o cálculo das notas médias foram atribuidas as notas 0, 1, 2 e 3, às frutas com 0, 1 a 9, 10 a 30 e mais de 30 manchas, respectivamente.

Frutas	Data da leitura	Número de manchas por fruta				Nota média
		0	1-9	10-30	mais de 30	
Em frascos	21 e 29-5	16	9	11	7	1,21
	25-6	33	7	0	2	0,31
	total	49	16	11	9	0,77
Testemunhas	22 a 24-5	0	3	7	21	2,58

Nota-se que as frutas que amadureceram mais tarde estavam muito menos manchadas que as outras.

Experiência de 1940-1941: Na experiência anterior, pareceria a primeira vista que os frascos de vidro, contrariamente ao que ocorrera em 1939, não impediram completamente o acesso às frutas, do vetor ou agente da doença, pois um número bastante consideravel de frutas apresentava manchas. Como, entretanto, quando os frascos foram colocados, em fins de Janeiro, as frutas já tinham dimensões bastante grandes, maiores do que no ano anterior na mesma época, julguei provável que as manchas das frutas protegidas em frascos proviessem de infecções anteriores à colocação dos frascos. Esta suposição é apoiada pelo fato da percentagem de frutas manchadas ser muito menor no grupo cuja leitura foi feita em fins de Junho. Este grupo, de maturação mais atrazada que os dois cuja leitura fora feita em fins de Maio, tinha provavelmente frutas menos desenvolvidas quando colocadas em frascos e por isto menos suscetíveis à infecção de leprose.

A presente experiência foi, por este motivo, começada muito mais cedo quando as frutas ainda eram bem pequenas. Utilizou-se a mesma árvore do que nas experiências anteriores. A colocação dos frascos processou-se da seguinte maneira: Em 18 e 19 de Dezembro de 1940 foram colocadas 280 frutas em frascos. Em 31 de Janeiro mais 50 frutas foram colocadas em frascos. No mesmo dia foram retirados os frascos de 50 frutas da primeira série, as quais foram novamente colocadas em frascos em 20 de Março. Em 3 de Março foram retirados os frascos de mais 50 frutas, recolocados em 3 de Abril. Nesse dia foram retirados mais 50 frascos, recolocados

em 3 de Maio e finalmente em 5 de Maio foram retirados os frascos de mais 50 frutas. Da primeira série de 280 frutas sobraram portanto 80 frutas que permaneceram encerradas em frascos durante toda a experiência. As frutas testemunhas, num total de 50, escolhidas ao acaso na mesma árvore, foram encerradas nas armações de arame em 15 de Abril.

A leitura dos resultados foi feita em 30 e 31 de Maio de 1941, sendo as frutas classificadas em 4 grupos, de acôrdo com o número de manchas de leprose que apresentavam, como na experiência anterior. Perderam-se, por diversas causas, 119 laranjas nesta experiência.

Na estampa 26 estão representadas algumas laranjas representativas de cada grupo desta experiência. Os resultados constam da tabela 2.

Tabela 2 — Distribuição, de acôrdo com o número de manchas de leprose, e nota média, de laranjas doces protegidas contra a infecção por frascos de vidro colocados em diversas épocas e retirados durante diferentes periodos. Para o cálculo das notas médias foram atribuidas as notas 0, 1, 2 e 3, às frutas com 0, 1 a 9, 10 a 30 e mais de 30 manchas, respectivamente

Frascos			Número de manchas por fruta				Nota média
1.ª colocação	Retirada	2.ª colocação	0	1-9	10-30	mais de 30	
18/19-12-40 ...	—	—	58	3	0	0	0,05
31- 1-41 ...	—	—	20	7	2	0	0,36
18/19-12-40 ...	31-1-41	20-3	15	4	6	4	0,97
18/19-12-40 ...	3-3-41	3-4	13	6	6	6	1,16
18/19-12-40 ...	3-4-41	3-5	17	6	1	1	0,44
18/19-12-40 ...	5-5	29-5	35	4	1	1	0,22
Testemunhas			0	0	9	36	2,80

Constata-se que a infecção, muito fraca nas frutas expostas à infestação antes de 18 e 19 de Dezembro de 1940 e protegidas o resto do tempo até o fim da experiência, aumentou, alcançando o máximo nas frutas expostas de 3 de Março de 1941 a 3 de Abril, diminuindo a seguir até o mínimo das frutas expostas de 5 a 29 de Maio.

As manchas das frutas descobertas até 31 de Janeiro eram muito menos deprimidas e de coloração muito mais pálida que as das frutas descobertas durante os outros períodos (Est. 26, B).

Experiência de 1941-1942: Esta experiência, inteiramente executada pelo Sr. D. N. FRANÇA, consistiu na repetição da experiência anterior, apenas com pequenas alterações das datas de colocação e retirada dos frascos. Em 2 de Dezembro de 1941 foram colocadas em frascos 250 frutas da mesma laranjeira das experiências anteriores. Em 2 de Janeiro de 1942, mais 50 frutas foram colocadas em frascos e no mesmo dia foram retirados os frascos de 50 frutas da primeira série. Estes foram recolocados em 2 de Fevereiro, quando se retiraram mais 50 frascos da primeira série. Em 3 de Março estes foram recolocados, ao passo que eram retirados mais 50 frascos da mesma série. Em 2 de Abril foram retirados mais 50 frascos da primeira série. Como a maior parte das frutas já tinha maior diametro que o gargalo dos frascos foi necessário quebrá-los pelo que não sobraram bastante frascos para a recolocação nas frutas descobertas em 3 de Março. Estas frutas foram então encerradas em sacos de papel impermeavel em 2 de Abril. Em 2 de Maio foram quebrados os frascos das últimas 50 frutas da primeira série e foram encerradas em sacos impermeaveis as 50 frutas descobertas em 2 de Abril. As frutas testemunhas, em número de 50, escolhidas ao acaso da mesma árvore, foram encerradas nas armações de arame em Abril.

Tôdas as frutas foram colhidas em 5 de Junho e a contagem do número de manchas feita a seguir. Perderam-se 44 frutas por diversas causas. A tabela 3 dá a distribuição das frutas de acôrdo com o número de manchas que apresentavam assim como a nota media de cada grupo de frutas.

Tabela 3 — Distribuição de acôrdo com o número de manchas de leprose e nota média, de laranjas doces protegidas contra a infestação por frascos de vidro ou envelopes de papel impermeável, colocados em diversas épocas e retirados durante diferentes períodos. Para o cálculo das notas medias foram atribuidas as notas 0, 1, 2 e 3, às frutas com 0, 1 a 9, 10 a 30 e mais de 30 manchas respectivamente.

Frascos ou sacos			Número de manchas por fruta				Nota média
1.ª colocação	Retirada	2.ª colocação	0	1-9	10-30	mais de 30	
2- 1-42	—	—	43	0	0	0	0,00
2-12-41	2-1-42	2-2-42	37	0	0	0	0,00
2-12-41	2-2-42	3-3-42	35	3	1	1	0,20
2-12-41	3-3-42	2-4-42 *	18	8	11	7	1,16
2-12-41	2-4-42	2-5-42 *	31	9	5	4	0,63
2-12-41	2-5-42	—	33	12	2	1	0,40
Testemunhas			0	5	21	19	2,32

(*) Em sacos de papel.

Como na experiência anterior houve aumento gradativo do número de manchas de uma série à outra até o mês de Março, e em seguida diminuição, até a colheita das frutas em 5 de Junho. Não houve infecção nas frutas descobertas em Dezembro e em Janeiro.

EXPERIÊNCIAS COM FRUTAS PROTEGIDAS EM CAIXAS DE TELA DE ARAME

Nas experiências com frascos de vidro a proteção contra a infecção deve ter sido completa, salvo nos casos de vedação imperfeita por rachadura do vidro ou deslocamento dos tampões de algodão que fechavam as partes superior e inferior dos frascos. A fim de ter uma ideia das dimensões do vetor ou agente causal da doença, então desconhecido, foram feitas concomitantemente com as experiências com frascos de vidro de 1940 e de 1941, experiências em que as laranjas foram encerradas nas caixas de paredes de tela de arame, acima descritas.

Na experiência de 1940 foi utilizada, além da laranjeira doce de pé franco que serviu às experiências com frascos de vidro, uma laranjeira doce da variedade Pera do mesmo pomar. As caixas de tela foram colocadas em 9 de Fevereiro na laranjeira doce e em 15 do mesmo mês na laranjeira Pera. Como testemunhas foram usadas, no primeiro caso, as da experiência com frascos de vidro feita ao mesmo tempo, e no caso da laranjeira Pera, 15 laranjas escolhidas ao acaso que foram encerradas nas armações de arame para testemunhas, acima mencionadas. As leituras foram feitas quando as frutas alcançaram a maturidade, ou seja em 21 de Maio e 25 de Junho para a laranjeira doce, cujas testemunhas foram examinadas em 22 e 24 de Maio, e em 25 de Julho, 19 de Agosto e 6 de Setembro para a variedade Pera, que tem período de maturação mais estendido e cujas testemunhas foram examinadas em 22 de Maio.

Em 1941 foi utilizada sòmente a laranjeira doce de pé franco de que 196 frutas foram colocadas em caixas de tela de arame em 25 de Dezembro de 1940. As leituras foram feitas em 27 e 29 de Maio e em 13 de Junho. Como testemunhas foram usadas as da experiência com frascos de vidro, feita ao mesmo tempo.

Perderam-se por diversas causas 13 frutas da laranjeira doce e 12 da laranjeira Pera na experiência de 1940 e 34 frutas na experiência de 1941. Os resultados para o restante das frutas constam da tabela 4.

Tabela 4 — Distribuição, de acôrdo com o número de manchas de leprose, e nota média, de laranjas protegidas contra a infecção por caixas de tela de arame de diversas malhas. Para o cálculo das notas médias foram atribuidas as notas 0, 1, 2 e 3, às frutas com 0, 1 a 9, 10 a 30 e mais de 30 manchas respectivamente.

Ano	Laranjeira	Malha	Número de manchas por fruta				Nota média
			0	1-9	10-30	mais de 30	
1940	Pé franco .	40	5	4	0	0	0,44
		28	1	5	0	0	0,83
		20	3	4	0	0	0,57
		14	3	2	3	0	1,00
		8	3	2	0	2	1,14
		Test.	0	3	7	21	2,58
1940	Pera	40	4	2	4	0	1,00
		28	7	0	2	0	0,45
		20	5	2	1	1	0,78
		14	7	2	1	1	0,64
		8	3	3	2	1	1,11
		Test.	1	0	1	13	2,73
1941	Pé franco .	40	25	3	1	0	0,17
		28	17	16	5	0	0,68
		20	22	11	3	0	0,47
		14	17	8	4	4	0,85
		8	13	7	5	1	0,77
		Test.	0	0	9	36	2,80
Totais das 3 experiências		40	34	9	5	0	0,40
		28	25	21	7	0	0,66
		20	30	17	4	1	0,54
		14	27	12	8	5	0,83
		8	19	12	7	4	0,90
		Test.	1	3	17	70	2,72

Comparando os resultados das frutas em caixas com os das testemunhas, concluí-se que as caixas, mesmo as de malhas largas, como as de malha 8, ofereceram um obstáculo considerável à infestação das frutas. Em conjunto, quanto maior o tamanho das malhas, maior o número de manchas, embora o aumento desse número de acôrdo com o do tamanho não tenha tido uma regularidade inteiramente satisfatoria.

DISCUSSÃO

Como no caso das experiências sôbre a transmissão natural às fôlhas (BITANCOURT 1955b), teria sido muito desejável que tivesse sido calculado um erro experimental para apreciar as diferenças entre as notas medias dos diversos grupos de laranjas. Pelas mesmas razões expostas no trabalho citado isto não foi possível devido à ignorân-

cia em que nos achavamos acêrca do tipo de distribuição das manchas de leprose nas frutas. A interpretação dos resultados numéricos deve portanto ser feita com cautela, aceitando-se sòmente como significativas as diferenças de notas médias suficientemente grandes e os resultados que oferecem bastante regularidade. As diferenças entre as notas médias das testemunhas e das frutas encerradas em frascos ou caixas estão nesse caso e a regularidade da variação das notas medias nas tabelas 2 e 3 é bem patente.

O conhecimento que hoje temos da etiologia da leprose, graças às pesquisas realizadas na Argentina (FREZZI 1940, VERGANI 1945), permite explicar facilmente os resultados das experiências que acabam de ser relatadas. E' muito provavel que o agente da doença, ou mais provavelmente o seu vetor, seja em São Paulo como na Argentina um pequeno ácaro. Na Argentina trata-se de *Tenuipalpus pseudocuneatus* BLANCH., um tetraniquideo vermelho que mede aproximadamente 1/4 de mm de comprimento por 1/6 de mm de largura (BLANCHARD 1940). Um ácaro dessas dimensões pode facilmente atravessar as telas de arame as mais finas utilizadas para a confecção das caixas em que foram colocadas as laranjas. De fato, a malha de 40 fios por polegada deixa um espaço de mais de 1/2 mm entre os fios. E' certo, porém, que mesmo sem impedir completamente a passagem dos ácaros, as telas de arame constituiram um obstáculo apreciavel, tanto mais eficiente quanto a tela era mais fina. Isto fez com que as laranjas que permaneceram nas caixas de telas mais finas tiveram, em geral, menor número de manchas que as outras. Na experiência de 1940 que foi começada muito tarde, isto é, em 9 de Fevereiro, é provavel que muitas frutas já estavam infestadas quando foram encerradas em caixas, o que deve ter contribuido para diminuir o efeito destas últimas.

Os frascos de vidro, quando bem fechados com suas tampas de algodão, sem dúvida alguma constituiram para os ácaros um obstáculo intransponivel. Nas experiências de 1940 e de 1940-1941, as frutas que permaneceram descobertas até os últimos dias de Janeiro, apresentaram uma pequena percentagem de frutas manchadas. Nas experiências de 1939 e de 1941-1942, entretanto, as frutas descobertas até fins de Janeiro e protegidas em seguida, não se mostraram manchadas. Esta diferença é provavelmente devida a uma maior precocidade das frutas em 1940 e 1941, que fez com que elas já tivessem alcançado o tamanho em que começam a se tornar suscetível à leprose quando foram colocadas nos frascos de vidro. Esta suposição é apoiada pelo fato que, em 1940, as frutas que amadureceram mais tarde, e portanto tiveram desenvolvimento mais atrazado, tinham

menor número de manchas que as frutas de maturação mais precoce. Não se pode, entretanto, eliminar uma outra possibilidade que é dos ácaros terem começado a se multiplicar mais tarde em 1939 e 1942, que em 1940 e 1941.

Se examinarmos as notas medias dos 6 grupos de frutas descobertas em diferentes épocas, nas tabelas 2 e 3, verificaremos que este número aumenta progressivamente, alcançando o máximo para as frutas que estiveram descobertas durante o mês de Março, diminuindo em seguida até as frutas descobertas em Maio. Embora esta variação possa traduzir uma variação concomitante da população de ácaros, é mais provavel que ela seja devida ao fato que a suscetibilidade da casca da laranja, pequena na fruta ainda nova, aumenta progressivamente até a fruta alcançar aproximadamente 2/3 do seu desenvolvimento, e diminui em seguida até a maturação. A pequena suscetibilidade das frutas novas manifesta-se não sòmente no menor número de manchas que apresentam, como no fato que essas manchas são menos acentuadas, isto é, menos deprimidas e menos escuras que as das frutas infetadas quando mais desenvolvidas. E' interessante lembrar aqui que as experiências sôbre a transmissão natural às folhas, descritas no trabalho anterior desta série (BITANCOURT 1955 b), mostram que pequenas laranjeiras podadas recentemente apresentaram menor número de manchas, após terem sido expostas à infestação debaixo de uma árvore doente, do que laranjeiras podadas a mais tempo e portanto com folhas mais desenvolvidas.

O amadurecimento precoce e a queda prematura das frutas atacadas de leprose ficou bem demonstrado pela comparação das frutas caidas no chão e das que ainda estavam presas à arvore, entre as testemunhas da experiência de 1939-1940.

STUDIES ON THE "LEPROSIS" DISEASE OF CITRUS
III — NATURAL TRANSMISSION TO THE FRUITS

Abstract

In experiments performed in 1939, 1940, 1940-1941 and 1941-1942, young fruits of a sweet orange seedling tree were enclosed in glass jars well stoppered with cotton wool, so as to preclude the access of the disease agent or vector to the rind of the fruit.

At the end of the experiment, i. e. when the fruits were ripe, leprosis spots on the rind were counted and the fruits were distributed in classes, numbered 0, 1, 2 and 3, according to the number of spots they had, viz.: 0, 1 to 9, 10 to 30, and more than 30 spots per fruit, respectively. The mean class number of each group of

fruits of the experiment was used as a disease index for comparisons between groups.

In the 1939 experiment the glass jars were placed on January 26, 28 and 30 and readings were made on June 5, when the fruits were ripe. Out of 22 fruits protected in glass jars, only 3 showed a few spots, the rest of the fruits being entirely free of leprosis spots. Their disease index was therefore 0.14. The disease index of 22 fruits picked at random from the same tree, which showed from 0 to 21 spots, was 0.77. Fruits picked from the ground around the disease tree showed a much larger number of spots than those still on the tree.

In 1940 the jars were placed on January 26, 27, 29 and 31. Some fruits, used as checks, were enclosed in wire baskets so that they would not fall to the ground when ripe. Readings were made as the fruits ripened on May 21 and 29 and June 25. The disease index of the fruits ripe in May was 1.26, of the fruits ripe in June, 0.31 and of the checks 2.58. Inasmuch as the late ripened fruits were also less developped at the time they were placed in the glass jars, these results show that the younger fruits are more resistant to leprosis.

In the 1940-1941 and the 1941-1942 experiments the glass jars were removed for periods of approximately one month throughout the fruiting season. Readings made when fruits were ripe gave the following disease indices:

Fruits discovered in	1940-1941	1941-1942
December	0.05	0.00
January	0.36	0.00
February	0.97	0·20
March	1.16	1.16
April	0.44	0.63
May	0,22	0.40
Checks	2.80	2.32

In both experiments maximum infection occurred in March, when fruits were just passed the middle of their development. In the 1941-1942 experiment very young fruits were not infected. The occurrence of infection in January in the 1940-1941 experiment is explained by early fruit setting and development.

In parallel experiments in 1940 and 1941, fruits of the same sweet orange seedling tree and, in 1940, also of a sweet orange tree of the Pera variety, were enclosed in boxes made up of wire screen

of 8, 14, 20, 28 and 40-mesh. The disease index for all the fruits of each type of box was:

Mesh	*40*	*28*	*20*	*14*	*8*	*Checks*
Index	*0.40*	*0.66*	*0.54*	*0.83*	*0.90*	*2.72*

Comparison with the high index of unprotected checks shows that all the screens afforded protection against infection, the index being roughly proportional to the size of the mesh.

From the studies made in Argentina it is now known that the causal agent or vector of leprosis is a mite: Tenuipalpus pseudocuneatus. It is obvious that the glass jars and the screen boxes have impeded or at least considerably hindered the passage of the mites from the foliage of the diseased tree to the surface of the fruits.

BIBLIOGRAFIA

BITANCOURT, A. A. — 1934 — As Manchas das Laranjas. Descrição das principais manchas, podridões e outras alterações das laranjas, e dos meios para combate-los. *Inst. Biol. S. Paulo.* Folh. 53. 135 pp.

BITANCOURT, A. A. — 1955 a — Estudos sobre a leprose dos Citrus I — Distribuição geográfica e sintomatologia. *Arq. Inst. Biol.* S. Paulo 22: 161-184.

BITANCOURT, A. A. — 1955 b — Estudos sobre a leprose dos Citrus. II — Transmissão natural às fôlhas. *Arq. Inst. Biol.* S. Paulo 22: 185-203.

BITANCOURT, A. A. — 1955 c — Estudos sobre a leprose dos Citrus. IV — Experiências de tratamento. *Arq. Inst. Biol.* S. Paulo 22: 219-231.

BLANCHARD, EVERARD E., — 1940 — Tres ácaros dañinos para los Citrus argentinos. *Rev. Fac. Agron. Univ. La Plata.* 24: 11-18. 1939 (1940).

FREZZI, M. J. — 1940 — La lepra explosiva del naranjo. Investigaciones realizadas por el laboratorio de patologia de Bella Vista (Corrientes). *Bol. Frutas y Hortalizas. Min. Agr. de la Nación* (Buenos Aires) 5: 16 pp.

VERGANI, A. R. — 1945 — Transmission y naturaleza de la "lepra explosiva" del naranjo. *Publ. Minist. Agric. B. Aires. Inst. Sanid. Veget. Serie A Año 1* n.º 3. 11 pp.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 24

Fig. *A* — Laranjeira doce de pé franco utilizada nas experiências de transmissão natural da leprose às frutas, do presente trabalho, e nas experiências de transmissão natural às fôlhas, do trabalho anterior desta série (Bitancourt 1955 b).

Fig. *B* — Detalhe da figura *A*, mostrando as caixas de tela de arame e os frasco de vidro em que foram encerradas as laranjas da árvore da figura A.

Fig. *C* — Telas de arame de malha de 8, 14, 20, 28 e 40 fios por polegada, utilizadas na confecção das caixas representadas na figura *B*.

Estampa 25

Fig. *A* — Frasco de vidro utilizado para encerrar as laranjas da laranjeira da fig. *A*. est. 24. Vê-se no frasco uma laranja desenvolvida de Janeiro a Junho de 1940.

Fig. *B* — Armação de arame para as laranjas testemunhas, destinada a impedir que a fruta caisse ao chão quando se desprendia do pedúnculo no momento da maturação. Vê-se dentro da armação uma laranja que esteve encerrada de Janeiro a Maio de 1941 e que se desprendeu do pedúnculo antes do fim da experiência.

Fig. *C* — Caixa de tela de arame de malha 14 para encerrar laranjas. Notar dentro da caixa o cilindro de tela de arame de galinheiro em que fica colocada a laranja e que a mantem afastada das paredes da caixa.

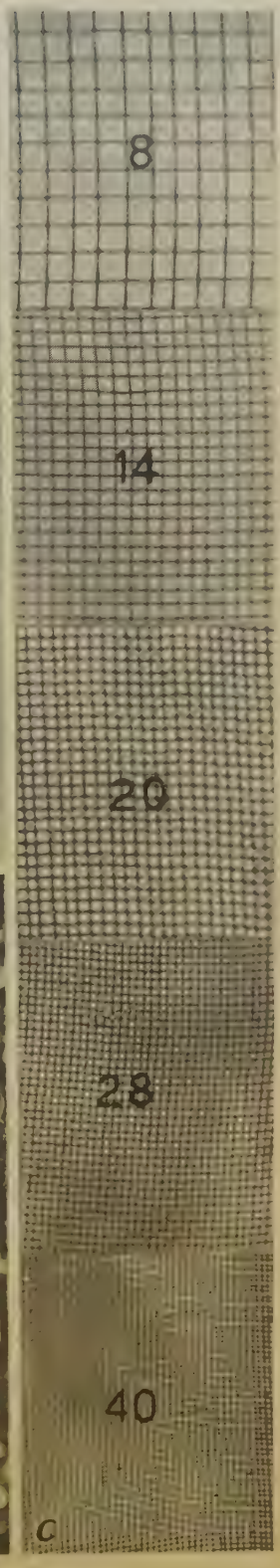
Estampa 26

Fig. *A* a *F* — Laranjas escolhidas entre as mais manchadas da experiência de 1940-1941 e que permaneceram encerradas em frascos de vidro de 18/19 de Dezembro de 1940 até a maturação (*A*), salvo durante os períodos de 18 de Dezembro a 31 de Janeiro (*B*), de 31 de Janeiro a 20 de Março (*C*), de 3 de Março a 3 de abril (*D*), de 3 de Abril a 3 de Maio (*E*), e de 5 a 29 de Maio (*F*). Nota-se que as manchas de leprose da fruta *B* são muito menos deprimidas e muito mais claras que as das outras frutas.

Fig. *G-H* — 2 laranjas testemunhas escolhidas entre as mais manchadas da mesma experiência.

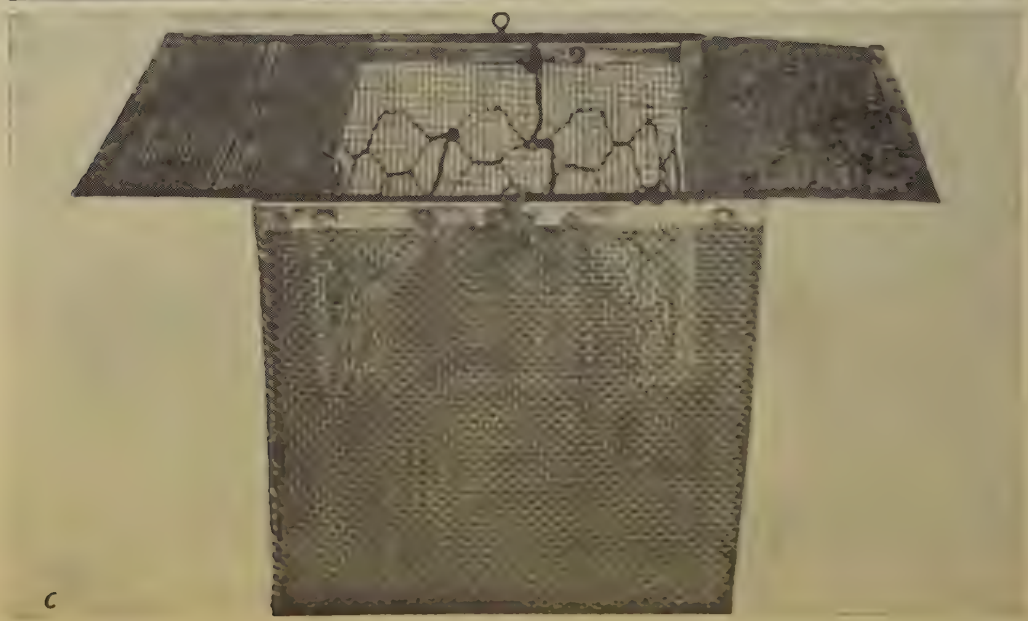
A

B


8
14
20
28
40
C

A

B



C

A
B
C
D
E
F
G
H

A

B

Vol. 22 — Artigo 17 Dezembro de 1955

ESTUDOS SÔBRE A LEPROSE DOS CITRUS
IV — EXPERIENCIAS DE TRATAMENTO

POR

A. A. Bitancourt

Do Instituto Biológico de S. Paulo

com a estampa 27

Como parte das pesquisas sôbre a leprose dos Citrus relatadas na presente série de trabalhos (BITANCOURT 1955 a, 1955 b, 1955 c), foram realizadas de 1933 a 1944, experiências sôbre o tratamento preventivo da doença.

Quando estas experiências foram iniciadas não se conhecia a etiologia da doença. E' verdade que, no Paraguay, SPEGAZZINI (1920) atribuira a doença, que designara por "lepra explosiva", ao fungo *Amylirosa aurantiorum* SPEG., FAWCETT e BURGER (1911) publicaram o resultado de experiências feitas na Florida em que pensavam ter demonstrado que a leprose era produzida pelo fungo *Cladosporium herbarum* (PERS.) LK. var. *citricolum* FAWC., e finalmente MARCHIONATTO (1935) relatara brevemente experiências de OFFERMANN que teria produzido a doença por inoculação de suco de plantas doentes. Hoje, entretanto, sabemos que os fungos increpados por SPEGAZZINI e por FAWCETT e BURGER, nenhuma responsabilidade têm pela doença e que a transmissão mecânica da leprose, apontando um virus como agente causal, não pôde ser reproduzida por VERGANI (1945). Este pesquisador, e anteriormente FREZZI (1940), demonstraram que na Argentina a leprose é transmitida por um ácaro, *Tenuipalpus pseudocuneatus* BLANCH., o que foi confirmado na Flórida por KNORR (1950).

A crença de que a leprose era produzida por um fungo fez com que, na Flórida, fosse aconselhado o emprego da calda bordalêsa para combater esta doença e foram publicados os resultados de experiências que indicavam a eficiência desse fungicida no contrôle da leprose (FAWCETT e BURGER 1911). Hoje em dia dificilmente se explica o sucesso alcançado nessas experiências, uma vez que conforme veremos, a calda bordalêsa não sòmente não controla a leprose como até, em certas ocasiões, aumenta sensivelmente a incidência da doença. A vista das recomendações dos fitopatologistas norte-americanos, entretanto, foi a calda bordalesa, associada à emulsão de óleo mineral, que aconselhamos aos citricultores nas nossas primeiras publicações sôbre as doenças dos Citrus e seu combate (BITANCOURT 1933, 1934).

Era, entretanto, preciso realizar experiências para verificar, dentro das condições de São Paulo, a eficiência dos tratamentos recomendados. Havia necessidade de determinar as melhores épocas de aplicação dos tratamentos e verificar se outros produtos em uso no combate às doenças das plantas cultivadas, não podiam substituir a calda bordalêsa com vantagem econômica ou mesmo com maior eficiência.

Três experiências, abrangendo o mesmo número de safras de laranjas, foram realizadas no pomar de Citrus do Horto Florestal da Cantareira, vizinho da sede da Secção de Fitopatologia do Instituto Biológico, uma experiência foi feita no campo experimental da Secção e quatro experiências, cobrindo o período de quatro safras de laranjas, foram efetuadas na Fazenda Experimental Mato Dentro, do Instituto Biológico, em Campinas.

As experiências na Cantareira foram conduzidas, de acôrdo com meus planos, pelo Dr. J. G. CARNEIRO, hoje falecido, que então dirigia o campo experimental da Secção de Fitopatologia. A primeira experiência em Campinas foi iniciada pelo Dr. S. FRANCO DO AMARAL e continuada, também de acôrdo com minhas instruções, pelo Dr. O. FALANGHE, diretor da Fazenda Mato Dentro que conduziu as três últimas. A esses técnicos e a seus auxiliares que executaram as operações, consigno aqui os meus agradecimentos.

EXPERIÊNCIAS NA CANTAREIRA

As experiências no pomar da coleção de Citrus do Horto Florestal, na Cantareira, foram executadas de 1933 a 1936. Elas não visavam tão sòmente a leprose, pois tiveram como fim verificar a eficiência dos tratamentos que então preconizavamos para prevenir a formação, na casca das frutas, de manchas de diversos tipos causadas por insetos, fungos e outros agentes (BITANCOURT 1934). Entre as doenças ocupava um lugar de destaque a leprose que, nas diversas variedades de laranjeiras doces do referido pomar, causava grande quantidade de lesões das frutas. Estas experiências esclareceram muitas dúvidas que tinhamos sôbre os tipos de parasiticidas e as épocas de aplicação dos tratamentos, mais adequados para o combate eficiente a essas pragas e doenças, e, em particular, para o tratamento da leprose.

O pomar constituía uma coleção de diversas espécies e variedades de Citrus que tôdas foram tratadas, mas sòmente consideraremos aqui os resultados obtidos com as laranjeiras doces. Havia 19 fileiras de 13 a 15 árvores, cada fileira sendo constituida de uma

variedade de laranjeira doce (*Citrus sinensis* Osb.) diferente. Estas árvores receberam diversos tratamentos, como poda mais ou menos intensa, caiação do tronco e pulverizações com inseticidas e fungicidas, preparados no local ou de marcas comerciais, então preconizadas para os tratamentos dos Citrus. Quando as frutas chegavam à maturidade, um certo número era colhido ao acaso e examinado, anotando-se as manchas ou lesões de diversas doenças e as pragas que apresentavam. Sòmente consideraremos neste trabalho os resultados referentes à leprose.

Experiência de 1933-1934: Cada linha de 19 árvores, constituida por um pé de cada uma das variedades de laranjeira doce do pomar, foi submetida a um tratamento diferente, exceto as linhas 1 e 8 que não foram tratadas e serviram de testemunhas. A linha 2 foi podada em Agosto, pulverizada com calda bordalêsa e emulsão de óleo em seguida, com calda sulfo-cálcica e extrato de fumo em Setembro, e com calda bordalêsa e emulsão de óleo em Outubro e novamente em Fevereiro. A linha 9 recebeu os mesmos tratamentos com exceção da poda. A linha 5 foi tratada da mesma maneira que a linha 2, menos a primeira pulverização de calda bordalêsa e emulsão de óleo e a pulverização de calda sulfo-cálcica e extrato de fumo. A linha 12 foi tratada como a linha 5 menos a poda. As linhas 4 e 11 foram pulverizadas com calda sulfo-cálcica e extrato de fumo em Setembro e com calda bordalêsa e óleo em Outubro; as linhas 3 e 10 com Solbar em Agosto, Setembro, Outubro e Fevereiro, as linhas 6 e 13 com o mesmo produto em Setembro e Outubro e as linhas 7 e 14 com o mesmo produto em Agosto e Outubro.

A poda consistiu na supressão de tôda a parte verde das árvores: fôlhas, galhos e ramos mais finos, deixando sòmente o esqueleto da árvore, ou seja o tronco e os ramos grossos e médios (Est. 27, A) (Bitancourt 1937, S. Franco do Amaral 1941). A calda bordalesa, a emulsão de óleo e a calda sulfo-cálcica foram preparadas de acôrdo com nossas instruções (Bitancourt 1934). A calda bordalêsa foi preparada na concentração de 1% de sulfato de cobre e a ela se acrescentou a emulsão de óleo mineral e sabão a razão de um quilo de emulsão por cem litros de calda. A calda sulfo-cálcica, preparada na Fazenda Mato Dentro, tinha a densidade de 26° Baumé e foi diluida em água na proporção de 1 para 50. A ela foi acrescentado 1% de extrato de fumo comercial, contendo nicotina numa quantidade equivalente a 4,7% do sulfato. O Solbar, um polissulfeto de bario, produto comercial, foi empregado na concentração de 1% na pulverização de Agosto e de 0,5% nas seguintes.

As frutas foram colhidas na maturação e um certo número delas, de cada árvore, foram examinadas para verificação das manchas de leprose. Os resultados desta experiência constam da tabela 1.

Tabela 1 — Tratamento, número de frutas examinadas, com e sem manchas, e percentagem de frutas manchadas, da experiência de 1933-1934. b.o.: calda bordalêsa e óleo; s. f.: calda sulfo-cálcica e extrato de fumo; sol.: Solbar.

Linhas	Tratamento				Frutas		
	Agosto	Setembro	Outubro	Fevereiro	Sem manchas	Com manchas	% manchadas
1,8	—	—	—	—	464	56	10,8
2	poda-b.o.	s. f.	b. o.	b. o.	140	0	0
5	poda	—	b. o.	b. o.	72	0	0
9	b.o.	s. f.	b. o.	b. o.	203	57	21,9
4,11	—	s. f.	b. o.	—	537	93	14,8
12	—	—	b. o.	b. o.	128	33	20,5
3,10	sol.	sol.	sol.	sol.	650	10	1,5
6,13	—	sol.	sol.	—	614	26	4,1
7,14	sol.	—	sol.	—	419	21	4,8

Vê-se que a poda suprimiu completamente a leprose. Mas a produção das árvores podadas foi reduzida às poucas frutas computadas na tabela. As pulverizações de calda bordalêsa e óleo causaram um aumento apreciável de manchas de leprose em relação às testemunhas, ao passo que o solbar parece ter controlado satisfatoriamente a doença.

Experiência de 1934-1935. No mesmo pomar da experiência anterior, tôdas as árvores, com exceção das linhas testemunhas 1 e 8, foram pulverizadas com calda bordalêsa e emulsão de óleo em Agosto, Novembro, Janeiro e Março e seus troncos foram caiados com pasta bordalêsa, pasta sulfo-cálcica ou Solbar a 5%. Estes últimos tratamentos, entretanto, não podem ter tido efeito sôbre a leprose. As árvores das linhas 3, 4, 10 e 11 foram podadas em Agosto, como tinham sido as linhas 2 e 5 em 1933. Os resultados desta experiência constam da tabela 2.

Tabela 2 — Tratamentos, número de frutas examinadas, com e sem manchas e percentagem de frutas manchadas da experiência de 1934-1935.

Linhas	Tratamentos	Frutas		
		Sem manchas	Com manchas	% manchadas
1, 8	Testemunhas	511	309	37,6
2, 5	Poda em 1933	868	32	3,6
3, 4, 10, 11	Poda em 1934	0	0	—
9,12	Calda bordalêsa e óleo em 1933	497	203	29,0
6, 7, 13, 14	Solbar em 1933	1.203	297	19,8

A poda suprimiu completamente a frutificação das árvores das linhas 3, 4, 10 e 11. Tôdas as linhas tratadas, quer no ano da experiência, quer no ano anterior, apresentaram menor número de manchas que as testemunhas. Não se reproduziu, portanto, o efeito da calda bordalêsa verificado no ano anterior. As árvores das linhas 2 e 5, podadas em 1933 e que, na safra de 1934, produziram laranjas sem manchas, apresentaram em 1935 algumas frutas manchadas, em número muito menor, porém, que as testemunhas. A percentagem de frutas manchadas nas linhas 6, 7, 13 e 14, que na experiência anterior tinham sido pulverizadas com Solbar e que, na safra de 1934 apresentaram poucas frutas manchadas, é menor do que nas linhas 9 e 12, que tinham sido pulverizadas com calda bordalêsa no ano anterior. Parece portanto, ter havido persistência do efeito do polissulfeto de bario, no ano seguinte à sua aplicação.

Experiência de 1935-1936 — No mesmo pomar das experiências anteriores as árvores das linhas 1 a 8 foram pulverizadas com Citrol, um óleo miscivel comercial, a 1,5%, calda bordalêsa a 1% e extrato de fumo a 0,8%, em Agosto e com Citrol a 1,5% em Outubro e em Fevereiro. As árvores das linhas 9 a 14 foram pulverizadas com Citrol a 1,5% e extrato de fumo a 0,8% em Agosto e com Fungol (um preparado comercial contendo 7% de oxicloreto de cobre e 74,5% de óleo mineral) a 1% em Outubro e em Fevereiro. Tôdas as árvores foram pulverizadas com Solbar a 1% em Novembro.

Verificou-se, na maturação das frutas, uma percentagem de frutas manchadas de leprose de 1,94 nas árvores que receberam o primeiro tratamento e 3,87 nas do segundo.

Experiência de 1940-1941: Para esta experiência foram aproveitados os pés de laranjeira doce utilizados na experiência de

transmissão natural da leprose, relatada no segundo trabalho desta série (BITANCOURT 1955 b), que maior número de manchas de leprose apresentavam. Estes pés, das variedades Lisa Paulista, Campista, Pele de Moça, Seleta branca, Seleta vermelha e Barão, foram plantados em 5 de Agosto de 1939 em 4 canteiros. Cada canteiro recebeu 24 pés com número aproximadamente igual de cada variedade. Os canteiros foram tratados respectivamente com calda bordalesa a 1%, calda sulfo-cálcica a 1 para 60 da solução-base a 32° Baumé e emulsão de óleo mineral (Citrol) a 1%. O último canteiro foi reservado como testemunha sem tratamento. A primeira pulverização de cada parasiticida foi feita em 2 de Outubro de 1939 e repetida todos os meses até o fim da experiência, salvo no caso da calda bordalêsa que provocou um aumento tão considerável da infestação de cochonilhas (principalmente *Lepidosaphes pinnaeformis* (BOUCHÉ) e *Pinnaspis aspidistrae* (SIGN.)), que alguns pés secaram e morreram (Est. 27, B). Por este motivo as pulverizações com calda bordalêsa foram suspensas depois da pulverização de 2 de Maio de 1940.

A experiência foi dada por terminada em Janeiro de 1941, quando foram feitas as seguintes observações.

Pés pulverizados com calda bordalêsa: Como acaba de ser dito, tôdas as plantas apresentaram uma enorme infestação de cochonilhas e a morte de várias delas deve ser atribuida a esses insetos. Cessadas as pulverizações, entretanto, os pés que não tinham morrido brotaram com viço, produzindo nova folhagem, perfeitamente isenta de cochonilhas, apesar da proximidade dêsses insetos no tronco e galhos. As fôlhas novas não apresentaram qualquer mancha de leprose (Est. 27, B).

Pés pulverizados com calda sulfo-cálcica e com emulsão de óleo mineral: Estes pés estavam completamente livres de manchas de leprose. Cairam portanto tôdas as fôlhas manchadas que se achavam presentes no inicio da experiência e que foram substituidas por fôlhas novas, não contaminadas, no decorrer da experiência.

Pés testemunhas: Quatro pés estavam isentos de lesões. Devem pois ter caido as fôlhas manchadas que eles apresentavam no inicio da experiência. Os pés restantes apersentavam manchas de leprose nas fôlhas em número variável, na maioria dos casos em número maior que inicialmente. Alguns tinham numerosas manchas, inclusive nas frutas que produziram em pequena quantidade apesar de serem plantas ainda novas. Nestes pés, por consequencia, devem ter ocorrido novas infecções no decurso da experiência.

Um relato mais detalhado desta experiência foi publicado em 1941 (BITANCOURT 1941).

EXPERIÊNCIAS EM CAMPINAS

Das 4 experiências realizadas na Fazenda Experimental Mato Dentro, do Instituto Biológico, em Campinas, entre 1940 e 1944, as três primeiras foram feitas no pomar de laranjeira doce var. Bahia e a última no pomar de laranjeira doce var. Pera, daquela Fazenda.

Experiência de 1940-1941: O pomar de Bahia contava então 2.255 árvores adultas, das quais 159 foram pulverizadas com calda bordalesa a 1% em 5 e 6 de Agosto, 6 e 7 de Novembro de 1940 e 7 de Janeiro de 1941. 169 árvores foram pulverizadas com calda sulfo-cálcica (solução a 1 para 40 da calda a 32° Baumé) em 6 e 9 de Agosto, 8 a 11 de Novembro de 1940 e 11 de Janeiro de 1941. 161 arvores foram pulverizadas com emulsão de óleo mineral miscivel (Laranjol) a 1%, em 10 e 11 de Agosto, 8 a 11 de Novembro de 1940 e 14 de Janeiro de 1941. 62 árvores doentes não receberam tratamento algum, para servirem de testemunhas. O restante das laranjeiras do pomar não apresentava sinais de leprose nas fôlhas.

Na maturação foram colhidas 100 laranjas ao acaso de tôdas as árvores de cada tratamento e 100 laranjas do pé mais atacado, de cada tratamento. As frutas foram classificadas em 4 grupos correspondentes às frutas sem manchas e com 1 a 10, 11 a 30 e mais de 30 manchas, respectivamente, sendo a nota 0, 1, 2 ou 3, dada a cada laranja de acôrdo com o grupo a que ela pertencia. A distribuição, de acôrdo com o número de manchas e a nota média das laranjas de cada tratamento constam da tabela 3.

Tabela 3 — Distribuição, de acôrdo com o número de manchas de leprose e nota média, de frutas provenientes de laranjeiras doces da variedade Bahia, submetidas a diversos tratamentos em 1940-1941. Para o cálculo das notas médias foram atribuidas as notas 0, 1, 2 e 3, às laranjas com 0, 1 a 10, 10 a 30 e mais de 30 manchas respectivamente.

Tratamento	Número de manchas em 100 frutas de diversos pés					Número de manchas em 100 frutas do pé mais atacado				
	0	1-10	11-30	mais de 30	nota média	0	1-10	11-30	mais de 30	nota média
Sem tratamento	75	23	1	1	0,28	43	41	14	2	0,75
Calda bordalêsa	80	19	1	0	0,21	66	32	2	0	0,36
Calda sulfo-cálcica ..	96	4	0	0	0,04	96	4	0	0	0,04
Oleo mineral	99	1	0	0	0,01	87	12	0	1	0,15

As árvores tratadas com calda bordalêsa apresentaram um menor número de frutas manchadas que as testemunhas. Tanto a emulsão de óleo mineral como a calda sulfo-cálcica reduziram substancialmente a infecção de leprose.

Experiência de 1941-1942: Esta experiência consistiu numa repetição da experiência anterior. As pulverizações foram efetuadas em 30 de Setembro e 24 de Novembro de 1941 e 24 de Janeiro de 1942. A colheita foi feita entre 2 e 6 de Junho de 1942, tendo-se em seguida procedido à contagem das manchas em 1.000 frutas de cada tratamento. A tabela 4 fornece o resultado desta experiência.

Tabela 4 — Distribuição, de acôrdo com o número de manchas de leprose e nota média de laranjas de árvores submetidas a diversos tratamentos em 1941 e 1942. Para o cálculo das notas médias foram atribuidas as notas 0, 1, 2 e 3 às laranjas com 0, 1 a 10, 11 a 30, e mais de 30 manchas respectivamente.

Tratamentos	Número de manchas por frutas				Nota média
	0	1-10	11-30	mais de 30	
Sem tratamento	812	161	20	7	0,222
Calda bordalêsa	933	59	6	2	0,077
Calda sulfo-cálcica	987	11	2	0	0,015
Oleo mineral	969	28	2	1	0,035

Esta experiência confirma a anterior e mostra a superioridade do óleo miscivel e principalmente da calda sulfo-cálcica para o contrôle da leprose. A calda bordalêsa causou um aumento consideravel da infestação de cochonilhas que era pequena nas testemunhas não tratadas. A calda sulfo-cálcica também causou um pequeno aumento das cochonilhas, ao passo que nas árvores pulverizadas com óleo a infestação era praticamente nula.

Experiência de 1942-1943: Nesta experiência as laranjeiras do mesmo pomar foram pulverizadas em 23 de Novembro de 1942 e 26 de Janeiro de 1943 com calda bordalêsa a 1%, calda sulfo-cálcica diluida a 1 para 40 ou óleo miscivel (Citrol) a 2%. Na maturação das frutas foram examinadas 1.000 frutas e 1.000 fôlhas de cada tratamento, salvo do tratamento com calda bordalêsa de que se examinaram 700 frutas e 980 fôlhas. Os resultados constam da tabela 5.

Tabela 5 — Percentagem de frutas manchadas e número médio de manchas por fôlha, de laranjeiras doces submetidas a diversos tratamentos em 1942-1943.

	Frutas manchadas %	Número médio de manchas por fôlha
Sem tratamento	16,9	0,020
Calda bordalêsa	34,2	0,164
Calda sulfo-cálcica	12,7	0,003
Oleo mineral	15,3	0,028

A calda bordalêsa parece ter causado um aumento considerável das manchas das frutas e das fôlhas, em relação à testemunhas. A calda sulfo-cálcica e o óleo mineral não tiveram um efeito tão pronunciado quanto nas experiências anteriores.

Experiência de 1943-1944: Esta experiência foi realizada no pomar de laranjeira doce da variedade Pera da Fazenda Mato Dentro. Não foi empregada a calda bordalêsa. A calda sulfo-cálcica a 1 para 50 da solução base a 32° Baumé ou o óleo miscivel (Citrol) a 1%, foram aplicados em 15 de Dezembro de 1943 e em 15 de Janeiro e 15 de Fevereiro de 1944, uma vez em uma dessas datas ou duas vezes, em duas delas. A leitura dos resultados foi feita em 31 de Junho.

A percentagem de frutas manchadas variou de 0,4 a 22,2 nos tratamentos com óleo miscivel, de 0,8 a 8,9 nos com calda sulfo-cálcica e foi de 12,3 nas testemunhas. A percentagem média nos tratamentos em que o óleo miscivel foi aplicado em Dezembro, com ou sem uma segunda aplicação em Janeiro ou em Fevereiro, foi 2,2. A dos tratamentos feitos em Janeiro, ou em Fevereiro, ou nesses dois meses, foi 18,9. Da mesma forma, para a calda sulfo-cálcica, a percentagem foi 2,8 para os tratamentos em Dezembro, e 5,4 para os dos dois outros meses.

Foi portanto, novamente confirmada a superioridade da calda sulfo-cálcica sobre o óleo miscivel. Os resultados também indicam que as aplicações em Dezembro são preferíveis às aplicações mais tardias.

DISCUSSÃO

Os resultados destas experiências não foram submetidos à análise estatística e não se conhece o erro experimental que os afeta. Um certo número de resultados, entretanto, são bem nítidos e permitem tirar algumas conclusões. Em primeiro lugar, a primeira experiência mostrou que a poda de todos os orgãos verdes, fôlhas e galhos, e dos ramos menores, suprimiu completamente a leprose, na safra seguinte. Esta safra entretanto, foi consideravelmente diminuida e na segunda experiência, a poda funda suprimiu completamente a frutificação seguinte. Nesta experiência verificou-se que as árvores podadas no ano anterior produziram algumas frutas manchadas, em proporção muito menor, porém, que as árvores submetidas aos outros tratamentos e que as testemunhas. Deve-se concluir, portanto, que a poda eliminou os ácaros vetores ou agentes da leprose, mas que mais tarde, houve pequena reinfestação das árvores podadas, por ácaros provenientes das árvores vizinhas que não

tinham sido podadas, ou simplesmente pela multiplicação dos poucos ácaros que escaparam à poda. E' provavel que, em árvores não tratadas posteriormente à poda inicial, o aumento da população de ácaros, em poucos anos, seja suficiente para que a leprose readquira a intensidade que tinha antes da poda.

Os resultados das pulverizações com parasiticidas poderão ser melhor apreciados si reunirmos os de diversas experiências como foi feito com as 6 experiências mais importantes na tabela 6.

Tabela 6 — Recapitulação dos resultados (percentagem de frutas manchadas) das experiências de tratamento de laranjeiras doces contra a leprose. Os compostos cúpricos são a calda bordalêsa e o Fungol (em 1934-1935); os polissulfetos são a calda sulfo-cálcica e o Solbar (em 1933-1934); os óleos minerais são a emulsão de óleo e sabão e os óleos misciveis do comercio (Citrol e Laranjol). Os números entre parenteses são os resultados de árvores tratadas no ano anterior. As 4 últimas colunas contêm os resultados das experiências de Campinas. As outras duas os das experiências da Cantareira.

Tratamentos	Anos 19—					
	33-34	34-35	40-41	41-42	42-43	43-44
Sem tratamento	10,8	37,6	25,0	18,8	16,9	12,3
Compostos cúpricos ..	17,4	(29,0)	20,0	6,7	34,2	—
Polissulfetos	3,3	(19,8)	4,0	1,3	12,7	4,1
Oleos minerais	—	—	1,0	3,1	15,3	10,5

Nessa tabela foram reunidos os resultados dos tratamentos com calda bordalêsa e com Fungol, cujo efeito se deve à presença do cobre; os tratamentos com calda sulfo-cálcica, um polissulfeto de cálcio de preparação local e com Solbar, um polissulfeto de bario do comercio; os tratamentos com emulsão de óleo mineral e sabão, de preparação local e com os óleos misciveis do comercio: Citrol e Laranjol.

Comparando os efeitos dos compostos a base de cobre com as testemunhas não tratadas, vê-se que a percentagem das frutas manchadas foi maior para os primeiros em 1933-1934 e em 1942-1943. Igual resultado foi obtido por KNORR e THOMPSON em sua experiência sôbre o combate à leprose por parasiticidas na Florida (KNORR e THOMPSON 1954). Nas outras experiências a calda bordalêsa parece ter causada uma diminuição da percentagem de frutas manchadas, especialmente em 1941-1942. E' provavel que o sulfato de cobre da calda bordalêsa exerça o efeito de um repelente para os ácaros, mas que de outro lado o revestimento de cal que esta calda deixa sôbre as plantas, facilite a circulação e disseminação

dos parasitas, como acontece com as larvas de cochonilhas, como será comentado adiante.

Tanto os polissulfetos como as emulsões de óleo mineral controlaram eficientemente a leprose, sem dúvida porque destróem o ácaro que a transmite. Os primeiros mostraram-se quase sempre superiores ao óleo.

As árvores pulverizadas com Solbar em 1933-1934, mostraram, na safra de 1945, uma percentagem de frutas manchadas muito menor que as testemunhas, o que indica uma persistência de efeito dêsse parasiticida no ano seguinte à sua aplicação. Isto deve ser atribuido à diminuição da população de ácaros em consequência das pulverizações do ano anterior.

O conhecido efeito da calda bordalesa sôbre a infestação de cochonilhas nos Citrus pôde ser constatado em tôdas as experiências, principalmente na de 1940-1941 na Cantareira. Neste caso as repetidas pulverizações com a calda bordalêsa causaram um tal aumento da população de cochonilhas que estes parasitas chegaram a cobrir a superfície total de algumas plantas que secaram e morreram (BITANCOURT 1941). Foi também notavel o aumento da infestação de cochonilhas nas experiências em Campinas (FALANGHE e BITANCOURT 1941). No decorrer das experiências pôde-se constatar que a propria calda sulfo-cálcica, com o deposito que deixa na superfície das plantas tratadas, também pode causar o aumento da infestação de cochonilhas.

Em conjunto, estas experiências permitem tirar as seguintes conclusões sôbre os tratamentos mais adequados para o combate à leprose:

1.º Nos casos de ataque grave, a poda total dos orgãos verdes, fôlhas, galhos e ramos menores, constitui a medida de combate inicial mais eficiente. Praticada no inicio do inverno, em Junho ou Julho, essa poda causará uma redução da produção de frutas na safra seguinte menos acentuada do que quando efetuada mais tarde. A poda tardia produz, como vimos, a perda total da safra e muitas vezes, também a redução da segunda safra após a poda.

2.º As aplicações de calda bordalêsa devem ser evitadas nos pomares muito atacados de leprose. Bem entendido nos casos em que esse fungicida precisa ser aplicado, — por exemplo quando há necessidade de combater a melanose e a verrugose, — deve-se sempre juntar emulsão de óleo à calda bordalêsa.

3.º A calda sulfo-cálcica e outros compostos a base de enxofre constituem um excelente meio de combate à leprose. A sua

aplicação deve ser feita ao mais tardar no mês de Dezembro, quando as frutas ainda estão pequenas.

KNORR e THOMPSON (1954) mostraram que, nas condições da Florida, os enxofres molháveis são extremamente eficientes e que uma só aplicação, durante o período de repouso da vegetação (entre nós seria no mês de Julho) é suficiente para controlar a doença. Eles obtiveram resultados comparáveis aos do enxofre com o DN (dinitro-o-ciclohexil-fenol) mas o Neotram (bis-(p-clorofenoxi) metana) produziu resultados inferiores.

STUDIES ON THE "LEPROSIS" DISEASE OF CITRUS
IV — CONTROL EXPERIMENTS

Abstract

The experiments were made at Cantareira and Campinas, State of São Paulo, from 1933 to 1944. Sweet orange trees of different varieties were either thoroughly pruned or sprayed with fungicides and insecticides or both. Thorough pruning, consisting in the removal of all the green parts of the tree, i. e. leaves and twigs, and also of the smaller branches, completely suppressed fruits spots in the next crop. The crop was, however, considerably reduced in one of the two pruning experiments and completely abolished in the other one. Trees that had been pruned the previous year had a percentage of affected fruits of 3.6% as against 37.6% in the checks.

In seven experiments covering the same number of years, trees that had been sprayed with copper-containing sprays, i. e. bordeaux mixture or Fungol (copper oxychloride) had percentages of affected fruits ranging from 6.7 to 34.2%. In two cases the percentage of affected fruits of sprayed trees was higher than that of the checks. Trees sprayed with sulphides: lime-sulphur spray and Solbar (baryum polysulphides), had the lowest incidence of leprosis spots on fruits, ranging from 1.3 to 12.7% while in the case of oil emulsion sprays like home-made emulsion or proprietary miscible oils (Citrol, Laranjol) the percentages ranged from 1.0 to 15.3. The percentage of the checks ranged from 10.8 to 37.6%.

BIBLIOGRAFIA

BITANCOURT, A. A. — 1933 — Doenças dos Citrus, *in* Manual de Citricultura, IIa parte, Doenças, pragas e Tratamentos. Ed. Chacaras e Quintaes. São Paulo. p. 7-78.

BITANCOURT, A. A. — 1934 — As manchas das laranjas. Descrição das principais manchas, podridões e outras alterações das laranjas, e dos meios para combatê-las. *Inst. Biol. S. Paulo.* Folh. 53. 135 pp.

BITANCOURT, A. A. — 1937 — A leprose e a próxima colheita de laranjas. *Biológico* 3: 37-40.

BITANCOURT, A. A. — 1941 — O tratamento da leprose dos Citrus. *Biológico* 7: 149-152.

BITANCOURT, A. A. — 1955 a — Estudos sôbre a leprose dos Citrus I — Distribuição geográfica e sintomatologia. *Arq. Inst. Biol.* S. Paulo 22: 161-184.

BITANCOURT, A. A. — 1955 b — Estudos sôbre a leprose dos Citrus II — Transmissão natural às fôlhas. *Arq. Inst. Biol.* S. Paulo 22: 185-203.

BITANCOURT, A. A. — 1955 c — Estudos sôbre a leprose dos Citrus III — Transmissão natural às frutas. *Arq. Inst. Biol.* S. Paulo 22: 205-218.

FALANGHE, O., & BITANCOURT, A. A. — 1941 — A infestação de cochonilhas nas frutas e as pulverizações das laranjeiras. *Biológico* 7: 192-193.

FAWCETT, H. S., & BURGER, O. F. — 1911 — A variety of *Cladosporium herbarum* on *Citrus aurantium* in Florida. *Phytopath.* 1: 164-166.

FRANCO DO AMARAL, S. — 1941 — A poda da laranjeira no tratamento da leprose. *Biológico* 7: 183-186.

FREZZI, M. J. — 1940 — La lepra explosiva del naranjo. Investigaciones realizadas por el laboratorio de patologia de Bella Vista (Corrientes). *Bol. Frutas y Hortalizas. Min. Agr. de la Nacion* (Buenos Aires) 5: 16 pp.

KNORR, L. C. — 1950 — Etiological association of a *Brevipalpus* mite with Florida scaly bark of citrus. (Abstract). *Phytopath.* 40: 15.

KNORR, L. C., & THOMPSON, W. L. — 1954 — Spraying trials for the control of Florida scaly bark in Citrus. *Plant. Dis. Rept.* 38: 143-146.

MARCHIONATTO, J. B. — 1935 — Argentine Republic: new studies on the "lepra explosiva" of the orange. *Int. Bull. Pl. Prot.* 9: 173-175.

SPEGAZZINI, C. — 1920 — Sôbre algunas enfermedades y hongos que afectan las plantas de "agrios" en el Paraguay. *Ann. Soc. Cient. Argentina* 90: 155-188.

VERGANI, A. R. — 1945 — Transmisión y naturaleza de la "lepra explosiva" del naranjo. *Publ. Minist. Agric. B. Aires. Inst. Sanid. Vegetal, Série* A, Año 1, n.º 3, 11 pp.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 27

Fig. *A* — Poda completa das partes verdes das árvores, para tratamento da leprose. Experiência de 1933-1934, na Cantareira, linha 2.

Fig. *B* — Pés de laranjeira doce de diversas variedades pulverizados mensalmente com calda bordalêsa de 2 de Outubro de 1939 a 2 de Maio de 1940. A calda causou um aumento considerável da infestação de cochonilhas que por sua vez produziu a seca e morte da maioria dos pés. Os que não secaram produziram, depois da interrupção das pulverizações uma brotação de folhagem sadia, isenta dos insetos. Fotografado em 22 de Janeiro de 1941.

Vol. 22 — Artigo 18 Dezembro de 1955

DIVISÃO MULTIPLA DE TOXOPLASMA EM CULTURA DE TECIDOS

POR

Maria Pereira de Castro

Do Instituto Biológico de S. Paulo

Com as estampas 28 e 29

INTRODUÇÃO

A controversia que tem havido sobre a classificação do *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1908) provém do desconhecimento que ainda existe do ciclo biologico da especie, cujo estudo baseou-se principalmente nos casos de toxoplasmose, espontaneos ou experimentais, pois todas as tentativas para cultivar o protozoario nos meios classicos, isentos de celulas, falharam.

Esse o motivo que levou LEVADITI *et al.* (9) a tentarem, em 1929, a infecção de culturas de tecido feitas "in vitro". Partindo de fragmentos de cerebro de pombo e de encefalo de pinto, com toxoplasmose, cultivava-os em plasma de galinha, com ou sem adição de fragmentos de embrião de galinha. No prazo de três a dez dias encontravam toxoplasmas ou livres na fase liquida ou parasitando celulas (p. 1079): "... soit à la phase de tomontes, libres, éparpillés dans le plasma, au voisinage des fibroblastes, soit au stade schizogonique, inclus dans les mononucléaires, ou encore dans les cellules épithéliales de certains fragments d'embryons de poulet". Não há duvida que, por essa tecnica, o toxoplasma foi cultivado em cultura de tecidos. Entretanto as ilustrações do artigo mostram claramente que os autores se equivocaram quando consideraram como "esquizogonia" a forma de parasitismo intracelular — meras celulas abarrotadas de toxoplasmas.

SABIN & OLITZKY (24) confirmaram em 1937, com tecnica mais requintada, as conclusões do trabalho anterior relativas à cultivabilidade do parasita, que exigiria, para o seu desenvolvimento, um meio de cultura tão complexo que só o citoplasma da celula viva poderia proporcionar. Pouco depois tomariam impulso as publicações referentes ao cultivo do parasita em culturas de tecido, visando elucidar duvidas a respeito do seu modo de multiplicação — GUIMARÃES & MEYER (7), MEYER & OLIVEIRA (15, 16) e MEYER (14), confirmadas por MÜHLPFORDT (17) e LOCK (10).

O problema do metodo de multiplicação dos toxoplasmas dividiu os pesquisadores em duas correntes. Alguns reconhecem a ocorrencia do processo esquizogonico (25, 26, 27, 4, 13, 1, 9, 22, 12); outros

a negam, admitindo somente a existencia da divisão binaria longitudinal — NICOLLE & MANCEAUX (18, 19) e talvez a totalidade dos autores mais recentes (20, 21, 23, 7, 6, 5, 17).

WENYON (28), GUIMARÃES (6) e GUIMARÃES & MEYER (7) atribuem as aparencias de esquizogonia a deficiencias de tecnica: sendo os pseudocistos muito compactos, com grande quantidade de parasitas, estes se corariam com dificuldade, dando a impressão de um citoplasma homogeneo onde só os nucleos se destacariam. Além disso, invocam o fato de nunca ter sido demonstrada a existencia dos estados iniciais do processo esquizogonico.

CROSS (5) chega ao ponto de admitir que a aparencia de esquizogonia pode ser simulada pela presença frequente de toxoplasma em pedaços de citoplasma anucleados, ou ainda pela confusão com certas celulas da linhagem sanguinea que acorrem a processos inflamatorios diversos. Acresce que os ultimos autores (22, 12) que reconheceram processos esquizogonicos lidaram com infecção mixta de *Toxoplasma* e *Plasmodium* (11), donde a possibilidade de confusão com as formas exoeritrociticas do ultimo tipo de parasita.

Como as infecções em culturas de tecido estão livres da maioria das objeções que podem ser feitas aos achados em animais infectados, e como estava muito controvertida a interpretação dos fatos relativos à multiplicação dos toxoplasmas, passamos a investigar a questão em cultura de tecido. Este artigo traz os primeiros resultados obtidos a respeito de um tipo de divisão que, em tudo nos pareceu muito semelhante ao processo esquizogonico de outros esporozoarios, e bem diverso do processo comum de divisão binaria que é conhecido nos toxoplasmas.

Queremos deixar nossos agradecimentos: a P. NOBREGA e seus colaboradores E. E. TRAPP, A. REIS, e M. GIOVANNONI da Seção de Ornitopalogia do Instituto Biologico, que nos ajudaram numa serie de problemas de ordem tecnica e material, além de nos fornecerem a cepa de toxoplasma com que trabalhamos; a C. PEREIRA, Chefe da Seção de Parasitologia Animal, pela orientação e conselhos e pela leitura dos originais; a H. MEYER e M. X. DE OLIVEIRA, do Instituto de Biofisica da Univ. do Brasil, que nos iniciaram na tecnica das culturas de tecido em gota pendente.

MATERIAL E TECNICA

As culturas de tecido foram feitas em gota pendente, segundo a tecnica classica de CARREL. O meio de cultura constava de 25 por cento de plasma de galinha, 25 por cento de extrato embrionario e 50 por cento da solução de Tyrode.

O primeiro explante foi retirado da membrana corio-alantoideia de ovo embrionado de 18 dias, previamente inoculado com toxoplasma. Subsequentemente, para cada dois repiques colocavamos um pedaço de tecido de embrião de 8 a 9 dias em contacto com o tecido infectado (4).

Muitas vezes usamos a tecnica seguinte: por ocasião dos repiques, depois de retirada a porção central da cultura, destinada a ser explantada para meio novo, procediamos à lavagem do restante da cultura com uma gota de Tyrode e uma gota de extrato embrionario, que em seguida montavamos novamente em lamina escavada e deixavamos na estufa por mais um ou dois dias.

Esta ultima tecnica proporcionou-nos resultados particularmente interessantes, porque as celulas que participam do crescimento na area central estendem-se muito bem sob a laminula, ficando em condições de exame bem melhores do que as que fazem parte da orla de crescimento nas culturas comuns.

O exame ulterior das culturas, a fresco, em contraste fasico ou após fixação e coloração, era sempre precedido por rapida lavagem em solução de Tyrode.

O fixador preferido foi a solução aquosa saturada de cloreto mercurico, acrescida de 10 por cento de formol. O material permanecia 5 minutos no fixador, 1 minuto em alcool iodado e 1 minuto em solução a 2 por cento de tiossulfato de sodio, sendo a seguir lavado em agua corrente.

A coloração preferida foi uma variante à agua do metodo Romanovsqui, baseada nos trabalhos iniciais de Giemsa, e que será publicada posteriormente em colaboração com C. PEREIRA.

RESULTADOS

Os resultados obtidos correspondem ao estudo acurado de uma cultura de fibroblastos de coração de galinha infectada com toxoplasmas, e mantida durante cerca de quatro meses através de 40 repiques. Observações esparsas anteriores que tinhamos feito não foram levadas em consideração. O grande numero de preparações examinadas permitiu verificar que os toxoplasmas apresentam dois tipos de reprodução: um, amplamente conhecido já, a divisão binaria longitudinal; outro, muito raro, ou melhor, aparecendo por surtos irregulares, indistinguivel da divisão multipla ou esquizogonia dos esporozoarios, e que parece não haver sido visto ainda em culturas de tecido.

Quanto ao tipo de multiplicação por divisão simples, nossos estudos confirmam integralmente as observações iniciais de GUIMA-

RÃES & MEYER (7) e se damos aqui suas caracteristicas é apenas para mostrar as diferenças que apresentam com o segundo tipo de multiplicação, em face da tecnica utilizada.

Divisão binaria simples — Depois da penetração ativa do parasita na celula, que em geral se processa muito rapidamente, começam os preparativos para a primeira divisão longitudinal. A primeira manifestação consiste num vacuolo que se forma em redor do parasita. Havida a primeira divisão, cada um dos organismos resultantes sofre nova divisão, em geral simultaneamente; como outras divisões podem ocorrer, também sincronicamente, disso resulta um aglomerado de toxoplasmas tipicos, todos com a mesma forma e o mesmo tamanho. À medida que se dão as divisões o vacuolo inicial vai-se ampliando, progressivamente, de modo a abranger todos os individuos da aglomeração.

Muitas vezes encontram-se aglomerações de toxoplasmas que ainda se mantêm ligados uns aos outros por um dos polos, o mais afilado; quando isso acontece em celula bem expandida, o conjunto de parasitas lembra a forma de uma penca de bananas. Quando as divisões se completam, em celulas bem achatadas na laminula, os toxoplasmas dispõem-se radialmente em rosaceas, que podem ter 4, 8, 16, 32 ou mais elementos. Quando a celula se encontra na profundidade da gota pendente, com as três dimensões como teria "in vivo" os toxoplasmas da aglomeração passam a se dispor como que em gomos de laranja. Os casos de infecção celular multipla redundam em celulas com duas ou mais rosaceas, cada uma correspondendo a um toxoplasma invasor.

A população de parasitas numa celula pode tornar-se muito grande, parecendo que seu limite depende da resistencia da membrana celular. Nos casos de infecção multipla, mesmo em celulas abarrotadas com duas ou três grandes rosaceas, observa-se uma certa simetria na disposição dos parasitas nas varias aglomerações. Além disso, cada aglomeração se conserva dentro do seu proprio vacuolo (Est. 28, Fig. *A, B, E* Est. 29, Fig. *A*).

Divisão multipla. — Nesta maneira de se multiplicar, a primeira diferença que se nota é a falta do vacuolo ao redor do parasita, que nunca deixava de existir na divisão binaria simples. Por conseguinte, o corpo do parasita fica em contiguidade com o citoplasma da celula hospedeira. As divisões são exclusivamente nucleares, formando-se a principio 2, depois 4, 8, 16, 32 e mais nucleos, sem que haja divisão do citoplasma do parasita (Est. 29, Fig. *B, C, D*).

O citoplasma do esquizonte difere do citoplasma da forma classica de toxoplasma por ser muito mais energicamente basofilo, exi-

gindo maior precisão nas colorações para que não se transforme num simples borrão azul-negro incaracteristico. Quando bem corado permite que se distingam areas claras esparsas, nas quais encontram-se nucleos de contorno aparentemente irregular, distinguiveis graças ao efeito Romanovsqui. Muitas vezes tais areas claras tomam a aparencia de vacuolos, e quando isso acontece verifica-se que os nucleos parecem mais compactos e nitidos (Est. 29, Fig. *E, F*).

A ausencia de vacuolo envolvendo as formas esquizogonicas do parasita ocorre em todos os estadios, mesmo os mais adiantados, permanecendo sempre contiguos os citoplasmas do esquizonte e da celula hospedeira (Est. 28, Fig. *D*, Est. 29, Fig. *D, E*). As exceções a esta regra são apenas aparentes: quando se notam pequenos vacuolos em redor do esquizonte, é facil verificar que se trata de vacuolos iguais aos pequenos vacuolos de qualquer outro lugar do citoplasma, em geral de gordura, e que apenas parecem traduzir o estado fisiologico da celula, parasitada ou não.

Assim como podia haver mais de uma rosacea de toxoplasmas numa celula, pode também haver mais de um equizonte numa celula (Est. 28, Fig. *E, F*). Além disso, é possivel encontrar celulas com os dois tipos de multiplicação (Est. 28, Fig. *E*, Est. 29, Fig. *E, D*), o que permite supor que a forma esquizogonica obedeça a um determinismo que independe do estado da celula parasitada.

DISCUSSÃO

A grande vantagem de se estudar o modo de reprodução dos toxoplasmas nas infecções em culturas de tecido consiste na eliminação de certas causas de erro que nem sempre podem ser evitadas completamente nas infecções de animais: a — infecções intercorrentes por outros esporozoarios, dando margem a duvidas sobre a natureza ou a origem dos achados microscopicos; b — fragmentação do citoplasma de celulas parasitadas, mormente nos esfregaços, que poderiam simular figuras de esquizogonia para investigadores mais afoitos; c — celulas parasitadas em desorganização, com o nucleo menos ou quase nada coravel, podendo dar a impressão de "cistos" esquizogonicos.

A interação de todos esses fatores, agravada por eventuais deficiencias tecnicas na fixação e na coloração de estruturas tão pequenas, fez que desde cerca de um quarto de seculo não se desse mais credito à existencia de esquizogonia no ciclo dos toxoplasmas. Além disso, as infecções de culturas de tecido até agora realizadas evidenciavam apenas a divisão binaria, nada revelando que sugerisse a existencia de um processo esquizogonico.

Nós mesmo, antes de adquirirmos a convicção da existencia de um segundo metodo de divisão, por exclusão de outras alternativas, mantivemos infecções do parasita em culturas de tecido por cerca de seis meses, certos da existencia apenas da divisão simples Enquanto isso, não só a tecnica de cultivo como a fixação e a coloração se tornavam cada vez mais refinadas, culminando na obtenção de series de preparações de interpretação segura. Chamamos a atenção para esse fato por já ter havido na literatura protozoologica tendencia para considerar como de esquizogonia determinada imagem apenas por ser ela complexa e confusa.

Deixando de lado as causas de erro inerentes à experimentação animal, abordaremos as objeções que poderiam ser feitas à experimentação em culturas de tecido.

Dada a raridade, ou melhor, as peculiaridades na incidencia do processo esquizogonico, poder-se-ia pensar que as imagens assim interpretadas não passassem de mera aglomeração de parasitas profundamente alterados em virtude de algum estado particular da celula hospedeira. No entanto, duas ordens de fatos parecem atestar a improcedencia desta objeção: a primeira consiste no encontro de todos os estadios de desenvolvimento do processo, desde os de 2 e 4 nucleos (Est. 28, Fig. *E, F,* Est. 29, Fig. *B, C*), até os de mais de 32 nucleos (Est. 29, Fig. *D*) ; a segunda é a presença na mesma celula, simultaneamente, dos dois processos de multiplicação. Na Est. 29, Fig. *D,* por exemplo, uma celula exibe, além de uma rosacea tipica, resultante de sucessivas divisões binarias longitudinais, contida no seu grande vacuolo, um compacto maciço basofilo com inumeros nucleos, em contacto direto com o citoplasma da celula hospedeira, e cuja aparencia é indistinguivel das formas esquizogonicas que se encontram em outras especies de esporozoarios.

Caso se confirme a natureza esquizogonica do processo de multiplicação que descrevemos, pensamos que ficaria definitivamente esclarecida a situação dos toxoplasmas entre os esporozoarios.

Ainda não encontramos resposta para a raridade ou irregularidade da ocorrencia do processo esquizogonico. Observamos que ele surge ocasionalmente, por surtos, mas com frequencia menor do que a do processo binario concomitante. Estamos procurando esclarecer a questão.

RESUMO

Foi descrito um processo esquizogonico de multiplicação de toxoplasmas, e comparado com o processo habitual de divisão binaria. As principais diferenças encontradas no comportamento dos dois processos foram as seguintes:

ESQUIZOGONIA	DIVISÃO BINARIA
Processo esporadico, por surtos.	Processo habitual.
Ausencia de vacuolo envolvendo o parasita.	Parasitas contidos num vacuolo.
Parasita em contacto com o citoplasma da celula hospedeira.	Parasita isolado do citoplasma da celula hospedeira pelo vacuolo.
O processo resulta em individuos dispostos desordenadamente.	O processo resulta em arranjos radiados (pencas e rosaceas).

MULTIPLE DIVISION OF TOXOPLASMA IN TISSUE CULTURE

Abstract

The process of reproduction by schizogonic division is described in Toxoplasma gondii cultivated in tissue culture.

In the past it has been described the schizogonic process in toxoplasma, but many doubts have arisen on the supposition that the early workers used faulty techniques and others, more recently, were dealing with double infections of toxoplasma and plasmodia. The process is very unusual and occurs besides the common one generally admitted by all the authors, that is, the reproduction by binary longitudinal division.

It has characteristic features, as the absence of vacuole surrounding the parasites. That is why the host cell's plasma is contiguous with that of the parasite.

The individuals resulting from the process are never arranged in a symmetric way as the ones resulting from binary longitudinal division.

The significance of this type of multiplication for the life cycle of the parasite is still unknown.

BIBLIOGRAFIA

1. Boëz, L. — 1921 — Schizogonie et lésions pulmonaires dans un cas de toxoplasmose spontanée du chien. *Compt. rend. Soc. biol.* 85: 479-82.
2. Carini, A. — 1909 — Reproduction expérimentale de la toxoplasmose du lapin. *Bull. Soc. path. exot.* 2: 465-9.
3. *Idem* — 1909 — *Idem. Ibidem* 2: 524-5.
4. Chatton, E. & Blanc, G. — 1917 — Notes et réflexions sur le toxoplasme du gondi (*Toxoplasma gundii* Ch. Nicolle et Manceaux, 1909). *Arch. Inst. Pasteur Tunis* 10: 1-40; 1951 — *Arch. Inst. Pasteur Maroc* 4: 245-90.
6. Guimarães, F. N. — 1943 — Toxoplasmose humana — Meningoencefalomielite toxoplasmica: ocorrencia em adultos e em recemnascidos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 38: 257-320.
7. Guimarães, F. N. & Meyer, H. — 1942 — Cultivo de "Toxoplasma" Nicolle & Manceaux, 1909, em culturas de tecidos. *Rev. brasil. biol.* 2: 123-9.

8. LAVERAN, A. — 1915 — Nouvelle contribution à l'étude du *Toxoplasma gondii*. *Bull. Soc. path. exot.* 8: 58-63.

9. LEVADITI, C., SANCHIS-BAYARRI, V., LÉPINE, P. & SCHOEN, R. — 1929 — Étude sur l'encephalo-myélite provoquée par le *Toxoplasma cuniculi*. II — Essais de culture des Toxoplasmes en présence de tissus *in vitro*. *Ann. Inst. Pasteur* 43: 1078-80.

10. LOCK, J. A. — 1953 — Cultivation of *Toxoplasma gondii* in tissue culture in mammalian cells. *Lancet* 264: 324-5.

11. MANWELL, R. D. — 1939 — Toxoplasma or exoerythrocytic schizogony in malaria? *Riv. malariol.* 18: 76-88.

12. *Idem* — 1941 — Avian toxoplasmosis with invasion of the erythrocytes. *J. Parasitol.* 27: 245-9.

13. MESNIL, F. — 1918 — Analyses — Sporozoaires: Chatton, E. & Blanc, G. (4). *Bull. Inst. Pasteur* 16: 70-3.

14. MEYER, H. — 1949 — *The cultivation of protozoa in tissue cultures*. Rio de Janeiro, Instituto de Biofisica, Universidade do Brasil.

15. MEYER, H. & OLIVEIRA, M. X. DE — 1943 — Conservação de protozoarios em culturas de tecido mantidas à temperatura ambiente. *Rev. brasil. biol.* 3: 341-3.

16. *Idem* — 1945 — Resultado de 3 anos de observação de cultivo de "Toxoplasma" (Nicolle & Manceaux, 1909) em cultura de tecido. *Ibidem* 5: 145-6.

17. MÜHLPFORDT, H. — 1952 — Das Verhalten von *Toxoplasma gondii* (Stamm Bk) in der Gewebekultur. *Ztschr. Tropenmed. u. Parasitol.* 4: 53-64.

18. NICOLLE, C. & MANCEAUX, L. — 1908 — Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondii. *Compt. rend. Acad. Sciences* 147: 763-6.

19. *Idem* — 1909 — Sur un protozoaire nouveau du gondi. *Arch. Inst. Pasteur Tunis* 2: 97-103; *Compt. rend. Acad. Sciences* 148: 369-72.

20. NÖLLER, W. — 1920 — Die Toxoplasmen. *In* Prowazek: *Handbuch der Pathogenen Protozoa*. Leipzig, Johann Ambrosius Barth., vol. 2: 907-18.

21. POISSON, R. — 1953 — Protistes parasites, intra- ou extra-cellulaires, d'affinités incertaines. *In* P.-P. Grassé: *Traité de Zoologie*. Paris, Masson et Cie. Éditeurs, vol. 1, fasc. 2: 990-5.

22. RAFFAELE, G. — 1932 — Sulle cosidette toxoplasmosi dei passeri. *Riv. malariol.* 11: 823-38.

23. REIS, J., NOBREGA, P. & REIS, A. S. — 1936 — *Doenças das Aves* (*Tratado de Ornitopatologia*). São Paulo, Edição do Instituto Biologico.

24. SABIN, A. B. & OLITSKY, P. K. — 1937 — Toxoplasma and obligate intracellular parasitism. *Science* 85: 336-8.

25. SPLENDORE, A. — 1908 — Un nuovo parassita de'conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo (Nota preliminare). *Rev. Soc. Scient. São Paulo* 3: 109-12.

26. *Idem* — 1909 — Sopra un nuovo protozoo parassita de'conigli (2.ª nota preliminare), *Ibidem* 4: 75-9; *Bull. Soc. path. exot.* 2: 462-5.

27. *Idem* — 1910 — Comunicação (sem titulo, 17-11-1910). *Ibidem* 4: 167-8.

28. WENYON, C. M. — 1926 — *Protozoology*. Londres, Baillière, Tindall & Cox. vol. 2.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 28

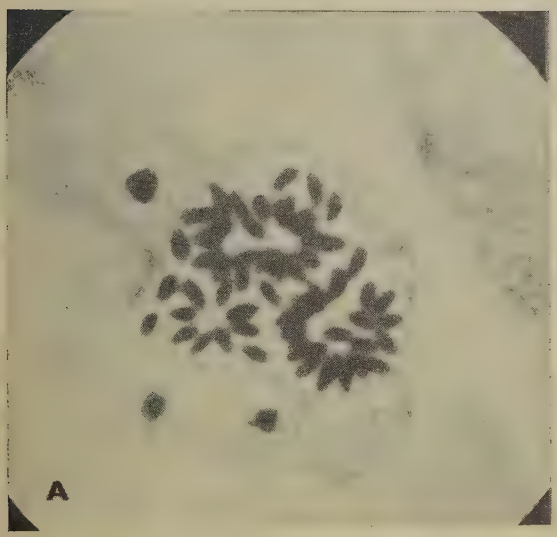
Fig. *A* — Divisão binaria: três rosaceas numa celula (900x).
Fig. *B* — *Idem:* aglomerado de pencas (900x).
Fig. *C* — Divisão esquizogonica: fase final do processo (900x).
Fig. *D* — *Idem:* duas celulas com o processo em fases diversas de desenvolvimento (900x).
Fig. *E* — Celula com uma rosacea (divisão binaria) e duas esquizogonias em desenvolvimento.
Fig. *F* — Celula com três esquizogonias distintas.

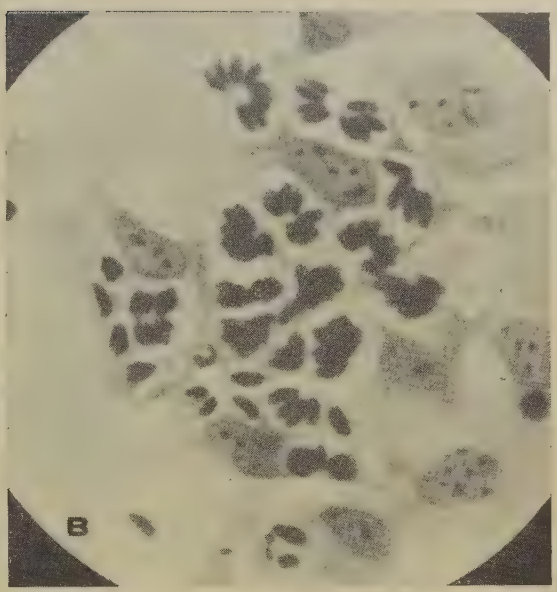
(Todas as figuras desta estampa são microfotografias tiradas pelo snr. Alberto Federman)

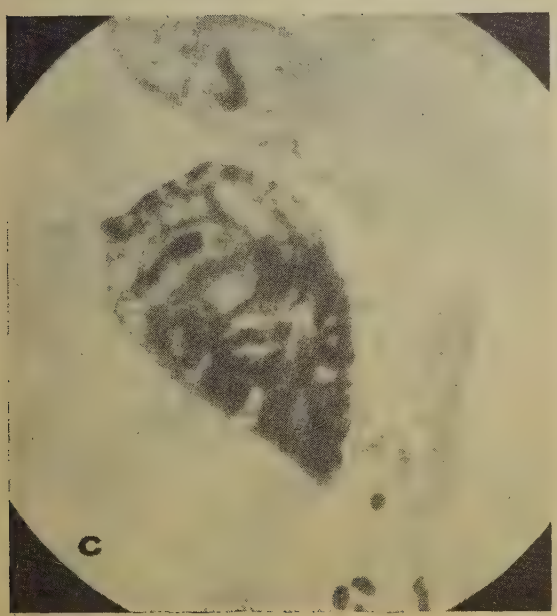
Estampa 29

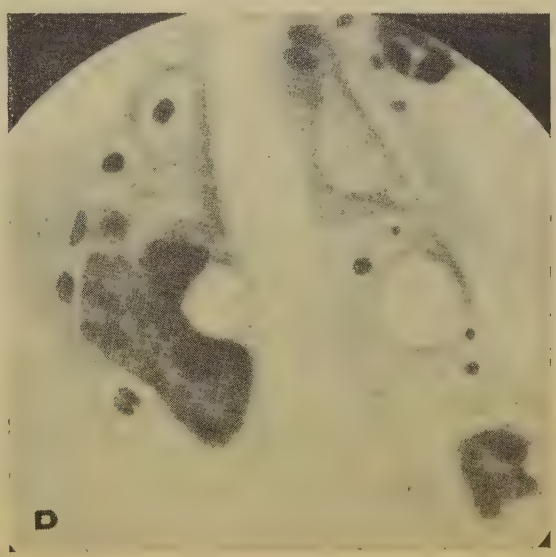
Fig. *A* — Rosacea proveniente de uma divisão binaria.
Fig. *B* — Divisão esquizogonica inicial: dois nucleos.
Fig. *C* — Divisão esquizogonica inicial: quatro nucleos.
Fig. *D* — Celula com uma esquizogonia em desenvolvimento e duas rosaceas (divisão binaria).
Fig. *E* — Outra celula em que tanto a esquizogonia como a divisão binaria estão mais adiantadas.
Fig. *F* — Esquizogonia adiantada em uma celula.

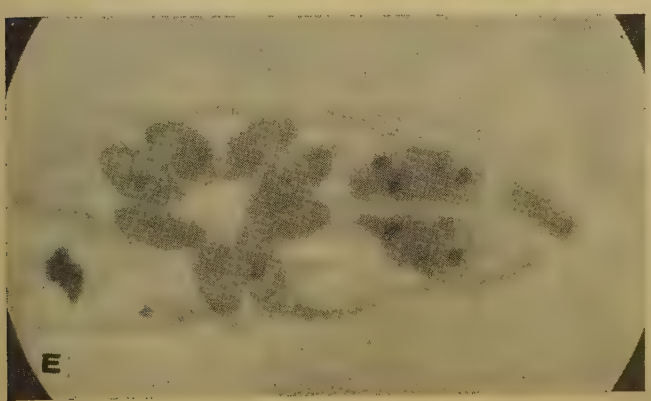
———o———

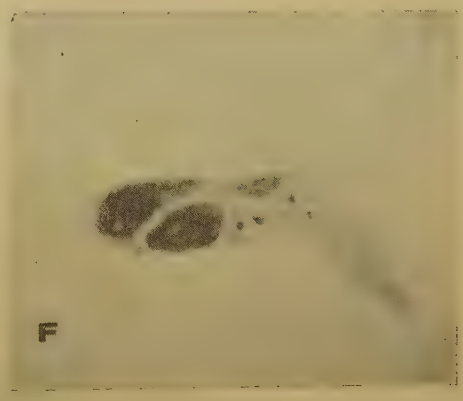

A


B


C


D


E


F

A
C
B
E
D
F
Lilly Althausen del.
10 μ

EMPRÊGO DA PROVA DA FIXAÇÃO EM SUPERFÍCIE DE CASTAÑEDA NO DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE SUINA.

POR

Ayamá D. Caldas e L. J. P. Machado

Do Instituto Biológico de S. Paulo

M. R. Castañeda (1) em 1950 descreveu um novo método prático que denominou de fixação em superfície (surface fixation), para demonstrar a união de antígeno e anticorpo. Êste método foi aplicado na prática para o diagnóstico da brucelose humana e bovina (2). A especificidade da prova no diagnóstico dos casos de brucelose humana sugeriu-nos verificar sua aplicabilidade no diagnóstico da brucelose suina, o que seria de suma importância porquanto a sôro aglutinação usual para o diagnóstico individual pode falhar, sendo relativamente frequente o isolamento da *Brucella* em suinos com soro-aglutinação negativa.

MATERIAL E MÉTODOS

Empregamos o sôro sanguíneo de suinos abatidos no matadouro municipal de Santo Amaro em São Paulo. As amostras de sangue eram colhidas em tubos de ensaio e após a coagulação separavam-se por centrifugação os soros que em seguida eram submetidos simultaneamente à prova da fixação em superfície segundo a tecnica descrita em trabalho anterior (3) e a prova da sôro aglutinação lenta segundo a técnica utilizada por AMARAL e colaboradores. (4)

RESULTADOS

Os resultados obtidos no estudo comparativo entre a prova da fixação em superfície de Castañeda e a sôro-aglutinação lenta em 385 soros de suinos estão resumidos na Tabela I.

Tabela I — Comparação entre o método da fixação em superfície de CASTAÑEDA e a soro-aglutinação lenta realizados em 385 suinos.

N.º de animais	Título da aglutinina	Resultados segundo a porcentagem da fixação em superfície				
		0%	25%	50%	75%	100%
292	Neg.	277	11	3	1	0
12	1:10	3	6	1	2	0
16	1:20	3	9	3	0	1
18	1:40	1	11	3	1	2
18	1:80	1	10	2	1	4
10	1:160	0	2	0	3	5
19	1:320	0	1	3	1	14
Total 385						

Da tabela I podem-se tirar várias observações:

1) — Pequenos títulos de aglutininas foram usualmente concomitantes com fracas "fixação em superfície";

2) — A intensidade da "fixação em superfície" aumentou com a elevação dos títulos das aglutininas;

3) — Considerável discrepância existiu nos soros com títulos de aglutininas negativos: cêrca de 5% (15 casos) deram "fixação em superfície" positiva, i. e., dos 292 soros-negativos pela soro aglutinação, 277 também foram negativos à "fixação em superfície", e 15 deram fixação em superfície positivas — onze, 25%; três, 50%; e um, 75%;

4) — Nos soros com títulos de aglutininas elevados i. e., igual ou acima de 1:160, não houve nenhum caso de fixação em superfície negativa;

5) — Dos 64 soros que aglutinaram entre 1:10 e 1:80, 12,5% (8 casos) tiveram fixação em superfície negativa.

DISCUSSÃO

Analisando os resultados obtidos, podemos concluir que em linhas gerais a prova da fixação em superfície de Castañeda acompanhou a soro aglutinação lenta, correspondendo assim a um título elevado, uma fixação em superfície também acentuada, a um título baixo ou negativo, uma fixação menor ou negativa. Nos casos de títulos de aglutininas elevados (igual ou acima de 1:160) salientamos mesmo a perfeita concordância dos resultados da fixação em superfície sem nenhum caso negativo, ou seja em suinos com brucelose evidenciada por título de aglutinina expressivo, a prova de Castañeda não falhou uma única vez. Existiu no entanto, a discrepância no grupo de soros com títulos de aglutininas baixos e negativos, casos êstes onde exatamente o diagnóstico seguro da brucelose suina pode ser comprometido pela simples interpretação do resultado da soro aglutinação. Assim, no 1.º grupo de discrepâncias, observamos que cêrca de 5% dos soros com títulos de aglutininas negativos deram resultados positivos na prova de Castañeda. Esta discrepância possivelmente situa-se exatamente nos mesmos casos de brucelose humana estudados por Castañeda: (2) doentes com títulos de aglutininas negativos (27 casos), mas, simultaneamente com hemoculturas e fixação em superfície positivas. Êste fenômeno, i. e., tal falha da soro-aglutinação em revelar os anticorpos de *Brucella*, o que não sucedeu na prova de Castañeda, dependeria da possível interferência do fenômeno de bloqueio. (5) A outra discrepância

referiu-se aos soros com títulos entre 1:10 e 1:80 dos quais 12,5% não apresentaram fixação em superfície, ou seja: três dos soros com título 1:10, três dos soros 1:20, um dos soros 1:40, e um dos soros 1:80 tiveram fixação em superfície 0%. Esta discrepância seria explicável possivelmente, relacionando-se êstes 8 casos aos do grupo contrôle de Castañeda, (2) no caso da brucelose humana, os quais com títulos também baixos, a semelhança do caso dos suinos (títulos entre 1:20 e 1:80), também deram fixação em superfície negativa e comprovadamente não eram casos de brucelose.

Considerando êsses resultados obtidos, à vista destas interessantes discrepâncias, dependendo naturalmente de comprovação pelo isolamento sistematico da *Brucella,* os suinos em relação à prova da fixação em superfície de Castañeda, comportar-se-iam exatamente como o homem e assim, esta prova teria também uma marcada especificidade no diagnóstico da brucelose suina. Achamos aconselhável, portanto, o emprêgo corrente desta prova de Castañeda, de execussão simples e rápida, ao lado da soro aglutinação, possibilitando assim um diagnóstico mais acurado, mesmos nos casos individuais de brucelose suina.

RESUMO E CONCLUSÕES

Os autores realizaram em 385 suinos um estudo comparativo entre a soro-aglutinação lenta e a prova da "fixação em superfície", de Castañeda, para o diagnóstico da brucelose, chegando às seguintes conclusões:

1) — Pequenos títulos de aglutininas em geral coincidiram com fracas fixações em superfície.

2) — A intensidade da fixação em superfície aumentou com a elevação dos títulos de aglutininas.

3) — Nos soros com títulos de aglutininas iguais ou superiores a 1:160, (29 casos) não houve nenhum caso de negatividade da fixação em superfície.

4) — Houve considerável discrepância nos soros com títulos de aglutininas negativas, isto é, dos 292 soros negativos pela soro-aglutinação, 277 também foram negativos à fixação em superfície e 15 (cêrca de 5%) deram fixação em superfície *positivas* — onze, 25%; três, 50%; e um, 75%. Esta falha da soro-aglutinação em demonstrar os anticorpos de *Brucella,* o que não aconteceu na prova no papel, dependeria da possível interferência do fenômeno de bloqueio.

5) — Outra discrepância foi observada no grupo de 64 soros com títulos entre 1:10 e 1:80 dos quais oito (12,5%) não apresen-

taram fixação em superfície, ou seja, três dos soros com título 1:10; três dos soros 1:20; um dos soros 1:40 e um dos soros 1:80 tiveram fixação em superfície 0%. Esta discrepância seria explicável, possivelmente relacionando-se estes 8 casos aos do grupo contrôle de Castañeda, no caso da brucelose humana, os quais com títulos entre 1:20 e 1:80 também deram fixação em superfície negativa e comprovadamente não eram casos de brucelose.

6) — Considerando êsses resultados obtidos, dependendo naturalmente de verificação pelo isolamento sistemático da *Brucella*, os suinos em relação à prova de fixação em superfície de Castañeda, comportar-se-iam exatamente como o homem e, do mesmo modo esta prova teria também uma marcada especificidade no diagnóstico da brucelose suina.

Finalizando os autores acham aconselhável o emprego corrente da prova da fixação em superfície de Castañeda, ao lado da soroaglutinação no diagnóstico da brucelose suina o que aumentaria as probabilidades de um resultado rápido e seguro.

SURFACE FIXATION METHOD (CASTAÑEDA) FOR DIAGNOSIS OF SWINE BRUCELLOSIS

ABSTRACT AND CONCLUSIONS

The A. A. performed a comparative study of "surface fixation" and tube agglutination test with 385 swine sera, for diagnosis of brucellosis, obtaining the following conclusions:

1) Low titres of agglutinin was usually concomitant with weak surface fixation tests.

2) The intensity of the surface fixation tests increase with increasing agglutinin titres.

3) In the sera with high agglutinin titres ($\geq$1:160) there was no one negative surface fixation test.

4) Considerable discrepancy have been observed with sera of negative agglutinin titres i. e. in 292 negative sera by the agglutination test, 277 failed also to produce surface fixation reaction, but 15 (nearly 5%) produced positive surface fixation tests of different intensity: 11 sera 25%; 3, 50%; and one 75%. Such failure as shown by tube agglutination, may depend on the possible interference by blocking phenomena, since in all these 15 cases antibody have been detected by surface fixation.

5) Another discrepancy have been observed with sera of agglutinin titres from 1:10 to 1:80 i. e. in 64 sera, 56 produced also positive surface fixation test, but 8 (12,5%) have given nega-

tive surface fixation: 3 out of the sera 1:10, 3 out of the sera 1:20, one 1:40 and onde 1:80. This discrepancy, possibly would be explainable by considering these 8 cases like the control group of Castañeda in the human brucellosis case, in which nearly 10% out of 221 patients suffering from various infections, excluding brucellosis, had also agglutinin titres of 1:20 to 1:80, with negative surface fixation.

6) The results of surface fixation tests both in the swine and human brucellosis cases, possibly would have the same interpretation, as comparable discrepancies have been verified in swine, while depending of verification by sistematic Brucella isolation. Thus the paper test of Castañeda would have also remarkable specificity in swine brucellosis.

The A. A. finally suggest the inclusion of surface fixation test in the routine methods for the detection of swine reactors, thus increasing the chance of obtaining a more accurate diagnosis.

BIBLIOGRAFIA

1) Castañeda, M. Ruiz — 1950 — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 73: 46.
2) Castañeda, M. Ruiz — 1953 — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 83: 36.
3) Caldas, A. D.; Planet, N. G.; e L. J. P Machado, *Arq. Inst. Biol.*, 22:
4) Amaral, J. P.; Taunay, A. E.; Novaes, J. R. C.; Planet, N. G.; e Esteves, M. B. — 1953 — *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 13: 169.
5) Griffits, J. J., — 1947 — *Publ. Health Rep.*, 62: 865.

São Paulo
TIPOGRAFIA BRASIL
ROTHSCHILD LOUREIRO & CIA. LTDA.
Rua Brigadeiro Tobias, 647-653
1956